ANTICUERPOS ANTI-VARIABLE DELTA 1 DE TCR MULTIESPECÍFICOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos y fragmentos y variantes de estos que se fijan específicamente al receptor de linfocitos T de linfocitos T gamma delta, y que se fijan específicamente a EGFR.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El creciente interés en inmunoterapia de linfocitos T para cáncer se ha enfocado en la evidente capacidad de subconjuntos de linfocitos T alfa beta (αβ) CD8+ y CD4+ para reconocer células cancerosas y para mediar potenciales funcionales protectores de huésped, en particular cuando se derreprimen mediante antagonismo mediado clínicamente de vías inhibidoras ejercidas por PD-1, CTLA-4 y otros receptores. Sin embargo, los linfocitos T αβ están restringidos por MHC, lo que puede generar enfermedad de injerto contra huésped.

Los linfocitos T gamma delta (linfocitos T γδ) representan un subconjunto de linfocitos T que expresan en su superficie un receptor de linfocitos T (TCR) γδ distinto que los define. Este TCR está formado por una cadena gamma (γ) y una cadena delta (δ), cada una de las cuales se somete a redisposición de cadena, pero tienen una cantidad limitada de genes V en comparación con linfocitos T αβ. Los principales segmentos génicos TRGV que codifican Vγ son TRGV2, TRGV3, TRGV4, TRGV5, TRGV8, TRGV9 y TRGV11 y genes no funcionales TRGV10, TRGV11, TRGVA y TRGVB. Los segmentos génicos TRDV más frecuentes codifican Vδ1, Vδ2 y Vδ3, además de varios segmentos V que tienen tanto designación Vδ como designación Vα (Adams *et al*., 296:30-40 (2015) *Cell Immunol*.). Los linfocitos T γδ humanos pueden clasificarse ampliamente en función de sus cadenas de TCR, ya que ciertos tipos γ y δ se encuentran en células con mayor prevalencia, aunque no de manera exclusiva, en uno o más tipos de tejido. Por ejemplo, la mayoría de los linfocitos T γδ que residen en la sangre expresan TCR Vδ2, comúnmente Vγ9Vδ2, mientras que esto es menos común entre los linfocitos T γδ que residen en el tejido, tales como los que se encuentran en la piel, que con mayor frecuencia usan el TCR Vδ1 apareado con cadenas gamma, por ejemplo, a menudo apareado con Vγ4 en el intestino.

Los linfocitos T γδ tienen una función crítica en la vigilancia inmunitaria, al reconocer células malignas o transformadas (tal como células cancerosas) a través de un patrón de marcadores de estrés y luego ejercer citotoxicidad potente y selectiva. Por lo tanto, los linfocitos T γδ pueden actuar como instrumentistas de una respuesta inmunitaria. La modulación de estas células *in situ* proporciona el potencial de aumentar la inmunogenicidad aun en tumores con baja carga mutacional, lo que ha demostrado ser difícil con otras inmunoterapias. El reconocimiento de tumores por los linfocitos T γδ no depende de un único antígeno tumoral y moduladores de

linfocitos T γδ, por lo tanto, tiene potencial en una variedad de indicaciones de enfermedades, que incluyen neoplasias tanto hematológicas como sólidas. El mecanismo de reconocimiento de linfocitos T γδ no está restringido por MHC.

Los autores de WO2019147735 hipotetizan que algunas células γδ tienen actividad protumoral o inhiben la respuesta inmunitaria antineoplásica mediada por los linfocitos T αß. Los autores postulan que los linfocitos T γδ son inmunosupresores y, por lo tanto, sugieren que deben ser agotados, inhibidos o bloqueados en un entorno de cáncer con la ayuda de anticuerpos.

Sin embargo, a pesar del enfoque predominante de que los anticuerpos anti-γδ modularán negativamente la función de las células γδ al bloquear o inactivar dichas células, se descubrió que existe una correlación positiva entre la infiltración de linfocitos T γδ y el pronóstico y/o la supervivencia en pacientes.

En comparación con las interacciones receptor/ligando de αβ TCR, la comprensión de las interacciones receptor/ligando de TCR vδ1 es limitada. En ausencia de dicha compresión, los anticuerpos que reconocen los TCR vδ1 en la actualidad son principalmente herramientas exploratorias para investigar esta interacción. Dichas herramientas son generalmente anticuerpos crudos de bloqueo que sugieren que las interacciones receptor/ligando de TCR dan como resultado el bloqueo, la supresión o la ablación de células vδ1+. Por ejemplo, los anticuerpos de herramienta TS8.2 y TS-1 se emplean como anticuerpos de bloqueo anti-γδ en estudios que sugieren que dichos anticuerpos reducen la citotoxicidad de células vδ1. Estos estudios, combinados con otros, sugieren que el uso de dichos anticuerpos anti-vδ1 modulan de manera favorable la citotoxicidad de las células vδ1 en un entorno de enfermedad *in situ* no es concebible y, por lo tanto, la necesidad de anticuerpos que aumenten, y no reduzcan, la citotoxicidad de vδ1.

Aprovechar los linfocitos T γδ para inmunoterapia requiere un medio para expandir los linfocitos *in situ* o recolectarlos y expandirlos *ex vivo* antes de volver a infundirlos. El último enfoque se describió previamente mediante el uso de la adición de citocinas exógenas, por ejemplo, ver WO2017/072367 y WO2018/212808. Los métodos para expandir los linfocitos T γδ propios de un paciente se describieron mediante el uso de formas modificadas farmacológicamente de hidroxi-metil but-2-enil pirofosfato (HMBPP) o aminobisfosfonatos aprobados clínicamente. Mediante estos enfoques, se han tratado más de 250 pacientes con cáncer, aparentemente de manera segura, pero con solo raras incidencias de remisión completa. Sin embargo, aún existe una necesidad de agentes activadores que tengan la habilidad probada de expandir grades cantidades de linfocitos T γδ.

Además, un agente de fijación o activador que pueda dirigirse o fijarse preferencialmente o reconocer o modular o aumentar específicamente la cantidad de células Vδ1+ *in-situ* puede ser altamente deseable como un medicamento.

Sin embargo, mientras que existen medicamentos que potencialmente modulan las células Vδ2+, que incluyen los aminobisfosfonatos tales como Zometa® (ácido zoledrónico), dichos medicamentos están diseñados principalmente para ralentizar la reabsorción ósea. E independientemente de dicha modulación de Vδ2+, existe una necesidad de desarrollar medicamentos diseñados específicamente para fijarse, dirigirse a, modular, activar o aumentar la cantidad de células Vδ1+. Esto se debe, por ejemplo, a que la modulación de Vδ2+ repetida puede dar como resultado un fenotipo duradero y progresivamente agotado.

Además, y dada la naturaleza residente en el tejido predominante de las células Vδ1+, un medicamente ideal capaz de modular Vδ1+ también exhibirá menos efectos no deseables 'secundarios' y rápida depuración renal. Habitualmente, dichos efectos no deseados pueden manifestarse al emplear sustancias químicas de moléculas pequeñas. Por ejemplo, los aminobisfosfonatos mencionados anteriormente que se demostró que pueden modular la clase separada de células Vδ2+ (como un efecto secundario en comparación con el efecto modulador primario en el hueso) se asocian con una toxicidad renal que se manifiesta como deterioro de la función renal e insuficiencia renal potencial (por ejemplo, Markowitz et al. (2003) Kidney Int. 64(1):281-289). Los efectos no deseados adicionales como los enumera la Agencia Europea de Medicamentos para Zometa incluyen anemia, reacciones de hipersensibilidad, hipertensión, fibrilación arterial, mialgia, dolor general, malestar, aumento de urea en sangre, vómitos, hinchazón de articulaciones, dolor de pecho, etc.

También se debe considerar el entorno *in situ* en el que se encuentran las células vδ1+. Por ejemplo, previamente se demostró que los linfocitos T γδ residentes en el tejido no hematopoyéticos mostraban una respuesta proliferativa fuerte cuando se separaban por primera vez del tejido, pero solo si no se encontraban en contacto celular directo con fibroblastos autólogos. Se descubrió que los linfocitos T residentes en el tejido no hematopoyéticos (linfocitos T γδ) se deben separar de las células no hematopoyéticas (por ejemplo, células estromales, particularmente fibroblastos) a fin de funcionar. Esto sucede porque el contacto directo de los linfocitos con células estromales o epiteliales parece inhibir la expansión de linfocitos T γδ residentes en el tejido. La observación de que las células preactivadas *in situ* existen en un estado adicionalmente suprimido es otra razón por la que las células vδ1 no han sido consideradas como una diana terapéutica prometedora hasta la actualidad. De hecho, hasta los descubrimientos descritos en la presente, no se ha concebido cómo se podría modular estas células *in situ* de manera favorable y selectiva, donde las células vδ1+ de sangre y tejido se consideran generalmente 'en reposo', 'preactivadas' o 'no activadas'.

Por lo tanto, existe una necesidad de medicamentos mejorados diseñados específicamente para dirigirse a células Vδ1+ y para el tratamiento de infecciones, afecciones autoinmunitarias y

cáncer. Específicamente, existe una necesidad de medicamentos que se puedan administrar para mejorar signos y síntomas de enfermedad al fijar específicamente células Vδ1+, dirigirse a células Vδ1+, activar específicamente células Vδ1+, mejorar específicamente la actividad de proliferación y/o citotoxicidad de células Vδ1+ o bloquear específicamente la activación de células Vδ1+.

Se desarrollaron diversos formatos de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos para una variedad de usos terapéuticos Los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos se pueden dividir en clases separadas, aunque superpuestas, en función de los tipos de dianas biológicas y modos de acción. Por ejemplo, dichos anticuerpos multiespecíficos se pueden dividir en clases tales como redireccionadores de células efectoras citotóxicas (también denominados anticuerpos biespecíficos que reclutan linfocitos T, acopladores de linfocitos T biespecíficos, TCE o BiTE) e inmunomoduladores duales (DI).

Los TCE (acopladores de linfocitos T) tienen como fin mejorar la respuesta inmunitaria del paciente contra tumores al dirigir los linfocitos T a células tumorales o viceversa, y funcionan al dirigir un primer epítopo de un complejo receptor de linfocitos T de un linfocito T (en general, CD3) y un segundo epítopo, que es un antígeno de cáncer o un antígeno asociado a cáncer, tal como un antígeno asociado a un tumor (TAA). Dichos anticuerpos colocalizan las células tumorales y los linfocitos T para promover la inactivación celular del tumor. Los ejemplos de BiTE incluyen el anticuerpo biespecífico CD3 x CD19 blinatumomab, el anticuerpo biespecífico CD3 x EpCAM catumaxomab y el anticuerpo biespecífico CD3 x HER2 ertumaxomab. Los TCE, tales como BiTE, se proporcionan por lo general en un formato scFv, aunque se han proporcionado otros formatos. Por ejemplo, los BiKE son similares a los BiTE, pero se dirigen a CD16 en células *NK*, en lugar de a CD3.

El receptor de linfocitos T se ha descrito como la estructura receptora más compleja del sistema inmunitario de los mamíferos. Comprende un complejo receptor multiproteico de transmembrana que comprende un receptor de linfocitos T cercano a una cantidad de cadenas de CD3. Por ejemplo, en mamíferos, dicho complejo típico comprende un receptor de linfocitos T, una cadena de CD3γ, una cadena de CD3δ y dos cadenas de CD3ε. Estas cadenas se asocian con el receptor de linfocitos T (TCR) junto con una cadena ζ (cadena zeta) que se combinan luego para generar las señales de activación habituales en linfocitos T. Sin embargo, también se han informado complejos alternativos. Por ejemplo, se describieron complejos receptores de linfocitos T que comprenden un receptor de linfocitos T y un homodímero de la cadena zeta. Los correceptores adicionales tales como CD4 y CD8 también pueden ayudar en la función de TCR.

Sin importar la composición del complejo receptor, se estableció que dichos complejos traducen los eventos de fijación de superficie celular a cascadas de señalización de fosforilación intracelular. Estos eventos de fosforilación culminan en la activación de los factores de

transcripción tales como NFAT y NFkB, que generan expresión aumentada de citocinas y proteínas efectoras tales como granzimas y perforina.

Sin embargo, mientras que el uso de dichos TCE para el tratamiento del cáncer continúa siendo un concepto atractivo, en la actualidad, e incluso después de 30 años de esfuerzos conjuntos para avanzar los TCE en desarrollo clínico temprano, muchos de dichos anticuerpos biespecíficos han exhibido seguridad, eficacia y perfiles de fabricación poco llamativos. De hecho, hasta enero de 2020, blinatumomab continúa siendo el único TCE aprobado no retirado. Este fragmento de anticuerpo multiespecífico de TCE se fija al complejo receptor de linfocitos T en un primer brazo de fijación y una diana CD19 en un segundo brazo de fijación.

Los anticuerpos reclutadores de linfocitos T biespecíficos se analizan en Lejeune *et al.*, 2020, Front Immunol., 11:762. Sin embargo, los anticuerpos biespecíficos que existen en esta categoría, en particular, los que reclutan linfocitos T mediante fijación de CD3, tienen efectos secundarios significativos que dan como resultado efectos adversos graves, dada la potencia del antígeno de CD3 como un transductor de señal y su ubicuidad en la población de linfocitos T de un paciente. Por lo tanto, para los ejemplos de biespecíficos que se dirigen a CD3, tales como Catumaxomab (retirado actualmente), la administración sistémica (por ejemplo, intravenosa) no es una posibilidad realista. En cambio, la administración más contenida, tal como intraoperatoria, intraperitoneal, intraabdominal, etc. se contempla más a menudo. Por lo tanto, esto limita la opcionalidad y el uso de dichos biespecíficos como medicamentos. De hecho, incluso para anticuerpos anti-CD3 atenuados para efector (es decir, un acoplador del complejo de linfocitos T que se dirige a CD3, pero no un biespecífico), la toxicidad asociada hace que la administración I.V. sea difícil. Por ejemplo, para limitar la exposición y reducir la toxicidad, el anticuerpo anti-CD3 Foralumab se contempla más a menudo en la actualidad para la administración oral (por ejemplo, en el tratamiento de enfermedad intestinal).

A menudo se indica que muchos de los obstáculos actuales observados con dichos TCE en ensayos clínicos tempranos se deben a los dominios de fijación del complejo de linfocitos T de alta afinidad empleados. Además, se ha propuesto que esto se debe a que las personas que diseñan estos TCE no consideraron debidamente la baja afinidad de los eventos de fijación del complejo TCR natural que se veían obstaculizados por las toxicidades graves que limitan la dosis, que dan como resultado ventanas terapéuticas prohibitivamente estrechas. En relación a esto, se resaltó que muchos desarrolladores de fármacos de TCE tempranos se basan en tres dominios de fijación del complejo de linfocitos T anti-CD3 derivados de OKT3, SP34 y UCHT1. Y todos estos dominios de fijación originales se fijaban con una afinidad relativamente alta en el rango de nM de uno a dos dígitos bajos, lo que equivalía a una afinidad aproximadamente 1.000 veces más alta que un evento de fijación natural. A su vez, se ha propuesto que esto puede dar como resultado efectos

profundamente diferentes (y a menudo desfavorables) en la activación de linfocitos T en comparación con la fijación natural del complejo receptor de linfocitos T. Por ejemplo, los desarrolladores de TCE que utilizaron plataformas basadas en la afinidad más alta de OKT3 pueden verse frustrados por el hecho de que OKT3 es apoptótico para linfocitos T en presencia de IL-2.

Por estas razones, se ha vuelto evidente que la fijación del complejo de linfocitos T de baja afinidad es una consideración importante para determinar los parámetros de diseño de terapéuticos de anticuerpo biespecífico que se acoplan a linfocitos T.

Otra cuestión al diseñar dichos TCE, es la necesidad de atenuar la función de Fc. De hecho, habitualmente los TCE requieren la inhibición completa de las funciones efectoras mediadas por Fc a fin de maximizar la eficacia terapéutica y minimizar la toxicidad secundaria debido a que la fijación de Fc al receptor gamma de Fc (FcγR) genera la activación de células efectoras inmunitarias. En realidad, la mayoría de los anticuerpos biespecíficos con direccionamiento de CD3 actualmente en la práctica clínica tienen dominios Fc con actividad reducida de fijación a FcγR o son fragmentos biespecíficos intencionalmente sin la región Fc. Se esperaría generalmente que un TCE con una función de Fc no atenuada induciría un efecto de citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC) y agotaría así la población de linfocitos T γδ reconocidos por el anticuerpo. Sin embargo, y nuevamente, al atenuar tal funcionalidad para evitar las complejidades de toxicidad/seguridad, también se puede atenuar ángulos de eficacia potencialmente importantes, por ejemplo, al acoplar células inmunitarias CD16+ o CD32+ o CD64+, o al reducir la semivida del biespecífico (por ejemplo, si se emplean fragmentos más pequeños de anticuerpo biespecífico, tales como BITE). Se esperaría que los métodos para reducir la interacción del FcγR y el TCE (tal como el uso de un formato IgG diseñado para reducir dicha interacción) reduzcan la inmovilización mediada por Fc del TCE y reduzcan el agrupamiento de TCR mediante reticulación con el TCE inmovilizado.

Para abordar algunas, pero no todas, de estas complicaciones, muchas compañías tales como Xencor (Pasadena, CA), Macrogenics (Gaithersburg, MD) y Genentech (San Francisco, CA) recientemente reportaron la reducción de la afinidad de fijación de los brazos de fijación del complejo receptor de linfocitos T en sus plataformas de TCE respectivas. Sin embargo, la reducción de las afinidades de dicha fijación puede dar como resultado menor eficacia efectiva y menor opcionalidad en términos de diseño de TCE y funcionalidad. Por ejemplo, se demostró que la afinidad de los dominios de fijación en dichos TCE impulsa el perfil de distribución *in vivo*. Específicamente, se suele observar que la distribución de TCE está sesgada hacia su diana de mayor afinidad. Por lo tanto, al reducir la afinidad de un dominio de fijación a TCE al complejo de linfocitos T, se suele sesgar luego la distribución fuera de los linfocitos T; los mismos linfocitos

necesarios para impulsar la eficacia en tales TCE. En parte es por dichas razones que las ventanas terapéuticas de TCE se denominaron "prohibitivamente estrechas".

Además, y en particular para tumores sólidos, aún existen obstáculos extras significativos para los terapéuticos inmunomodulatorios. Por ejemplo, los enfoques del estado de la técnica actuales incluyen biespecíficos que se dirigen a CD3 en donde un primer dominio se fija a CD3 y un segundo dominio se dirige a un TAA. Sin embargo, estos a menudo resultan problemáticos. Por ejemplo, Middelburg J, *et al*. Overcoming Challenges for CD3-Bispecific Antibody Therapy in Solid Tumors. *Cancers*. 2021; 13(2):287 resumen algunos de estos obstáculos en el espacio de tumor sólido para tales porciones inmunomoduladoras multiespecíficas que se acoplan con los linfocitos T, que incluyen:

i. cuestiones de toxicidad en la diana fuera del tumor, por ejemplo, los autores resaltan que los TAA de tumores sólidos a menudo también se expresan en tejido de órganos sanos, lo que a su vez puede generar patología inmunitaria y falla de órganos potencialmente grave, como se muestra en un estudio de ratón preclínico mediante el uso de biespecífico de CD3.

ii. la disponibilidad de células efectoras en el microentorno del tumor (TME), por ejemplo, existen linfocitos T "indiferenciados" CD3+ convencionales principalmente en la sangre y sistema linfático sin ninguna activación mediada por células dendríticas adicional.

iii. la calidad de los linfocitos que infiltran tumores (TIL), dado que estos pueden incluir Treg CD3+ y/o células CD3+ agotadas, por ejemplo, los biespecíficos que se dirigen a CD3 pueden inducir la apoptosis de TIL mediante la inactivación celular inducida por activación, lo que obstaculiza una fuerte respuesta antitumoral.

Por lo tanto, se necesitan medicamentos inmunomoduladores multiespecíficos mejorados en donde al menos un dominio de fijación se fije a un linfocito T y al menos un segundo dominio de fijación se dirija a un TAA.

También se necesitan medicamentos mejorados diseñados específicamente para dirigirse a células Vδ1+ y para el tratamiento de infecciones, afecciones autoinmunitarias y cáncer. Específicamente, existe una necesidad de medicamentos que se puedan administrar para mejorar signos y síntomas de enfermedad al fijar específicamente células Vδ1+, dirigirse a células Vδ1+, activar específicamente células Vδ1+, mejorar específicamente la actividad de proliferación y/o citotoxicidad de células Vδ1+ o bloquear específicamente la activación de células Vδ1+.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos con alta afinidad que comprenden múltiples sitios de fijación al antígeno ("anticuerpos multiespecíficos"), incluso un sitio de fijación al antígeno para variable delta 1 (Vδ1) de TCR y un sitio de fijación al antígeno para EGFR. Más específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos que comprenden

una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T γδ (TCR); y la región Fc comprende un sitio de fijación específico para EGFR.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención están en el formato denominado "anticuerpos mAb^2" o "anticuerpos mAb al cuadrado", que son anticuerpos que comprenden una región Fc que se diseñó por ingeniería genética para contener bucles de fijación al antígeno en su dominio CH3. Esta región Fc modificada se denomina "Fcab" (Fc con fijación al antígeno [*antigen binding*]). Las Fcab resultantes pueden insertarse rápidamente en un formato de anticuerpo IgG natural para crear anticuerpos biespecíficos mAb^2 tetravalentes que se fijan a dos antígenos diferentes. Por lo tanto, el anticuerpo mAb^2 comprende además una región Fab, que comprende un par de dominios VH-VL que proporciona un sitio de fijación al antígeno. Las moléculas mAb^2 de la presente invención comprenden una Fcab de fijación a EGFR y una Fab de fijación a vδ1.

Los anticuerpos de la presente invención tienen un perfil funcional ventajoso. En particular, a diferencia de los anticuerpos anti-Vδ1 del estado de la técnica que se enfocan en la disminución de linfocitos T Vδ1, los anticuerpos de la presente invención son útiles para la activación de linfocitos T Vδ1. A pesar de que pueden causar regulación descendente de los TCR en linfocitos T a los que se fijan, no ocasionan disminución de linfocitos T Vδ1, sino que estimulan los linfocitos T y por lo tanto pueden ser útiles en entornos terapéuticos que podrían beneficiarse de la activación de este compartimento de linfocitos T. La activación de los linfocitos T Vδ1 es evidente a través de la regulación descendente de TCR, cambios en los marcadores de activación tales como CD25, Ki67, marcador de desgranulación CD107a, NCR (receptores de citotoxicidad naturales) y/o 4-1BB. A su vez, la activación de los linfocitos T Vδ1 activa la liberación de citocinas inflamatorias tales como INFγ y TNFα para promover la licencia inmunitaria. Sorprendentemente, los anticuerpos que tienen adecuadamente alta afinidad para TRDV1 producen inactivación aumentada de linfocitos T Vδ1 y, a diferencia de (por ejemplo) los anticuerpos que se dirigen a CD3, la provisión de anticuerpos de alta afinidad es posible sin los efectos adversos asociados con la activación a gran escala a través de CD3. A su vez, los anticuerpos de alta afinidad pueden inducir efectos inmunoestimuladores fuertes a través de linfocitos que infiltran tumores (TIL). Esto se puede lograr con agotamiento o inactivación mínima de las células Vδ1. Por lo tanto, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden considerarse anticuerpos agonistas.

Las regiones Fcab comprendidas dentro de los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención tienen una interfaz de fijación más pequeña que los sitios de fijación a anticuerpos monoclonales típicos. Cuando los brazos Fab de un mAb típico están separados por una región bisagra flexible, los sitios de fijación de Fcab forman un fragmento de anticuerpo compacto con dos sitios de fijación ubicados cerca entre sí. Los dos sitios de fijación al antígeno de una Fcab también

están espacialmente cerca entre sí, en comparación con los de un mAb típico. En función de esta interfaz de fijación más pequeña y la menor flexibilidad de los dos sitios de fijación, resulta sorprendente que los anticuerpos multiespecíficos de la invención (que comprenden regiones Fcab) sean capaces de fijarse a EGFR e inhibirlo con afinidad y potencia similares a las de un anticuerpo monoclonal de referencia.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T γδ (TCR); y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo multiespecífico de la invención. Por ejemplo, se proporciona una secuencia de polinucleótidos que codifica el primer dominio de fijación anti-Vδ1 que comprende una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 199 a 222, 224 a 247, 249 a 259 o 261 a 271.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la invención. También se proporciona una célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótidos de la invención o un vector de expresión de la invención. También se proporciona un método para producir cualquier anticuerpo multiespecífico o fragmento de fijación al antígeno de este de la invención, que comprende cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo celular.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición que comprende un anticuerpo multiespecífico de la invención. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de la invención y un diluyente o portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Opcionalmente, las composiciones y composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit que comprende un anticuerpo multiespecífico de la invención o una composición farmacéutica de la invención, que comprende opcionalmente instrucciones para su uso y/o un agente terapéuticamente activo adicional.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico de la invención, o una composición farmacéutica de la invención. También se proporciona un método para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico de la invención o una composición farmacéutica

de la invención. La administración de anticuerpos a un sujeto puede ser una administración en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, o un kit de la invención, para su uso en medicina. También se proporciona el uso de un anticuerpo multiespecífico de la invención en la elaboración de un medicamento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Rondas de selección de fagos. (A) Rondas de selección de fagos 1 a 3 para la colección ADT1-7. **(B)** Rondas de selección de fagos 1 a 3 para la colección ADT1-4. **(C)** Rondas de selección de fagos 1 a 3 para la colección ADT1-4 con una estrategia de selección para aislar aglutinantes de reactividad cruzada de *Macaca fascicularis*.

Figura 2: Un resumen esquemático de selección de anticuerpos maduros mediante expresión en mamíferos. (A) Esquema de la clasificación de flujo de la colección ADT1-7. **(B)** Esquema de la clasificación de flujo de la ADT1-4 colección 1 (humano). **(C)** Esquema de la clasificación de flujo de ADT1-4 colección 2 (*Macaca fascicularis*).

Figura 3: Impacto del cambio de S74L sobre la afinidad. (A) Resultados de expresión en mamíferos de linaje ADT1-4: Constante de disociación humana (SPR) en comparación con fijación al antígeno humano (Delfia ELISA, 0,4 nM de antígeno humano) con el uso indicado de LC 74S (círculo abierto) o 74L (círculo relleno). Los resultados resaltan un buen ajuste entre afinidad mejorada por SPR y por fijación al antígeno por Delfia ELISA. Estos resultados también resaltan la fijación mejorada conferida por la modificación de dominio variable S74L. **(B)** Resultados de expresión en mamíferos de linaje ADT1-4: Constante de disociación de *Macaca fascicularis* (SPR) en comparación con fijación al antígeno de *Macaca fascicularis* (Delfia ELISA, 10 nM de antígeno de *Macaca fascicularis*) con el uso indicado de LC 74S (círculo abierto) o 74L (círculo relleno). **(C)** Resultados de expresión en mamíferos de linaje ADT1-4: Correlación entre mejoras en la constante de disociación de antígeno humano (SPR) en comparación con constante de disociación de *Macaca fascicularis* (SPR) más uso indicado de LC 74S (círculo abierto) o 74L (círculo relleno).

Figura 4: Uso e intercambio cruzado de CDR3. (A) Intercambio cruzado de cadena pesada y cadena liviana de ejemplo entre anticuerpos con maduración de afinidad en linaje ADT1-4 (G04) (0,4 nM resultados de ELISA de TRDV1 humana graduado en mapa de calor). Este "mapa de calor" demuestra el intercambio cruzado de secuencias de CDR3 entre anticuerpos con maduración de afinidad diferente en el linaje ADT1-4, que muestran secuencias de anticuerpos proporcionadas por proceso de maduración de afinidad que no tienen que ser proporcionadas como pares específicos de cadena pesada y liviana. Los resultados resaltan que los anticuerpos

con maduración de afinidad pueden intercambiar de manera cruzada cadenas livianas y cadenas pesadas y que las combinaciones de LC/HC diferentes generan resultados equivalentes o mejorados en un estudio de fijación al antígeno de alta especificidad. También se incluyen en la Figura el clon parental de ADT1-4 (G04), (inferior izquierda). **(B)** Selección final de linaje ADT1-4: Uso e intercambio cruzado de CDR3 + 'Mapa de calor' de fijación al antígeno de *Macaca fascicularis* en comparación con mAb de G04 parental de ADT1-4 parental de inicio (inferior izquierda). **(C)** Selección final de linaje ADT1-7: Uso e intercambio cruzado de CDR3 + 'Mapa de calor' de fijación al antígeno humano en comparación con mAb de E07 parental de ADT1-7 de inicio (inferior izquierda).

Figura 5: Mejora en veces de la fijación y para el linaje ADT1-4 en comparación con G04 parental de ADT1-4. **(A)** Mejora en veces de la fijación al antígeno Vδ1 humano recombinante. **(B)** Mejora en veces de la fijación al antígeno Vδ1 de *Macaca fascicularis* recombinante. **(C)** Mejora en veces de MFI Vδ1 primaria. **(D)** Mejora en veces de MFI de la línea celular PEER Vδ1.

Figura 6: Mejora en veces de la fijación y para el linaje ADT1-1 en comparación con E07 parental de ADT1-4. (A). Mejora en veces de la fijación al antígeno Vδ1 humano recombinante. **(B).** Mejora en veces de MFI Vδ1 primaria. **(C).** Mejora en veces de MFI de la línea celular PEER Vδ1.

Figura 7. Mejoras en veces de la fijación al antígeno humano (y de *Macaca fascicularis*) en comparación con los clones parentales. (A) Mejora en veces de la fijación al antígeno humano. Señal de DELFIA ELISA de clones con maduración de afinidad en comparación con ADT1-4 parental (G04), 0,4 nM de antígeno L1 humano recombinante (que contiene antígeno TCR Vδ1 humano). **(B)** Mejora en veces de la fijación a antígeno de *Macaca fascicularis* (DV1/GV77 que contiene SEQ ID NO: 308 de *Macaca fascicularis* (madura, menos líder)). Señal de DELFIA ELISA de clones con maduración de afinidad en comparación con ADT1-4 parental (G04), 0,4 nM de antígeno L1 humano recombinante. **(C)** Mejora en veces de la fijación al antígeno humano. Señal de DELFIA ELISA clones con maduración de afinidad en comparación con ADT1-7 parental (E07), 0,4 nM de antígeno L1 humano recombinante.

Figura 8. Mejoras en veces de KD para antígeno humano (y de *Macaca fascicularis*) en comparación con los clones parentales. (A) Mejora en veces de KD de antígeno humano para el linaje ADT1-4 (G04). **(B)** Mejora en veces de KD de antígeno de *Macaca fascicularis* para el linaje ADT1-4 (G04). **(C)** Mejora en veces de KD de antígeno humano para el linaje ADT1-7 (E07).

Figura 9. Análisis de afinidad de fijación (KD mediante SPR) a antígeno Vδ1 humano. (A) Resonancia de plasmones superficiales para linaje ADT1-4. **(B)** Resonancia de

plasmones superficiales para linaje ADT1-7. **(C)** Valores de KD y relación de cambio en comparación con el clon parental para el linaje ADT1-4. **(D)** Valores de KD y relación de cambio en comparación con el clon parental para el linaje ADT1-7. **(E)** Relación de cambio de KD en comparación con el clon parental para el linaje ADT1-4. **(F)** Relación de cambio de KD en comparación con el clon parental para el linaje ADT1-7.

Figura 10. Análisis de afinidad de fijación (KD mediante SPR) a antígeno de *Macaca fascicularis*. (A) Resonancia de plasmones superficiales para linaje ADT1-4 para antígeno de *Macaca fascicularis*. **(B)** Valores de KD para linaje ADT1-4 para antígeno de *Macaca fascicularis*.

Figura 11. Afinidad de fijación a TCR Vδ1 de la superficie celular (EC50 para fijación a Vδ1 de la superficie celular). (A, B) El nivel de fijación de los mAb Vδ1 para dos donantes de linfocitos T γδ, ATS006 (A) y TS164 (B). **(C)** Gráfico de barras que representan los valores promedio de 50 % de fijación de la fijación de los clones ADT1-4 y ADT1-7 a linfocitos T γδ Vδ1 positivos, representados como la media de dos donantes, en donde estos valores se proporcionan en tablas con % de mejora. **(D)** Tabla que resume las IC50 graficadas en (A) & (B), y tipos de células Vδ1 negativas que incluyen células HEK293A, Raji y diversos subconjuntos de leucocitos con células mononucleares de sangre primarias. Para linfocitos T γδ Vδ1 positivos, los datos se representan como la media de dos donantes.

Figura 12. Regulación descendente de TCR. (A, B) Linaje ADT1-4 (A) y linaje ADT1-7 (B). **(C)** Regulación descendente de TCR promedio – resultados de IC50 de dos donantes de células GD. **(D, E)** Regulación descendente de TCR de pliegue mejorada a partir de clon ADT1-4 parental (D) y el clon ADT1-7 (E). **(F)** Valores de 50 % de efecto de (C), con el porcentaje de mejora calculado a partir de los progenitores respectivos de ADT1-4 (superior) y ADT1-7 (inferior). **(G)** Valores de 50 % de efecto de (C), con la mejora en veces calculada a partir de los progenitores respectivos de ADT1-4 (superior) y ADT1-7 (inferior).

Figura 13. Anticuerpos monoclonales Vδ1 en activación de γδ medida mediante expresión de CD107a. (A, B) Clon ADT1-4-2 en células GD solas (A) o con células THP-1 (B). **(C, D)** Clon ADT1-7-3 en células GD solas (C) o con células THP-1 (D). **(E)** Tabla que representa el aumento de porcentaje en expresión de CD107a γδ a partir de células cocultivadas tratadas con la concentración más alta de mAb Vδ1 en comparación con células γδ no cocultivadas no tratadas. **(F)** Tabla que representa el aumento de porcentaje en expresión de CD107a γδ a partir de células cocultivadas tratadas con la concentración más alta de mAb Vδ1 en comparación con células γδ no tratadas, cocultivadas y no cocultivadas.

Figura 14. Anticuerpos monoclonales Vδ1 en activación de γδ medida mediante expresión de CD25. (A, B) Clon ADT1-4-2 en células GD solas (A) o con células THP-1 (B). **(C,**

D) Clon ADT1-7-3 en células GD solas (C) o con células THP-1 (D). **(E)** Tabla que representa el aumento de porcentaje en expresión de CD25 γδ a partir de células cocultivadas tratadas con la concentración más alta de mAb Vδ1 en comparación con células γδ no cocultivadas no tratadas. **(F)** Tabla que representa el aumento de porcentaje en expresión de CD25 γδ a partir de células cocultivadas tratadas con la concentración más alta de mAb Vδ1 en comparación con células γδ no tratadas, cocultivadas y no cocultivadas.

Figura 15. Regulación descendente de TCR de *Macaca fascicularis*. (A) Comparación de la capacidad de ADT1-4-2 y ADT1-4 para acoplar y reducir la expresión de VD1 en linfocitos T de γδ de *Macaca fascicularis*. **(B)** Porcentaje de expresión en superficie celular de VD1 tras el tratamiento con ADT1-4-2. **(C)** Valor de EC50 individual para diferentes donantes combinados con la desviación media y estándar.

Figura 16. Cuantificación de cantidades de células THP-1 vivas después de 24 horas de cocultivo con linfocitos T γδ en presencia de mAb Vδ1 o controles. (A) Ensayo de inactivación de células THP-1 para clones ADT1-4. **(B)** Ensayo de inactivación de células THP-1 para clones ADT1-7. **(C)** Media de EC50 en ensayo de inactivación de THP-1 para clones ADT1-4 y ADT1-7. **(D)** Tabla que resume los EC50 graficados en (C).

Figura 17. Anticuerpos monoclonales Vδ1 en citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

Figura 18. Anticuerpos monoclonales Vδ1 en citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Figura 19. Preservación de células sanas del clon ADT1-4-2.

Figura 20. Efecto de anticuerpos anti-Vδ1 sobre poblaciones de TIL de biopsias de tumores primarios. (A, B) Muestra el % de disminución en expresión de TCR Vδ1 en los linfocitos T γδ que infiltran tumores totales después de 48 (A) o 72 (B) horas de estimulación de mAb en dos donantes separados, lo que confirma el acoplamiento de la diana en cada caso. **(C)** Muestra la expresión mejorada de CD25 y Ki67 en linfocitos T Vδ1+ después de 48 horas de estimulación con ADT1-4-2 en comparación con estimulación con control de isotipo de IgG1 o ADT1-4. **(D)** Muestra aumentos en veces sustanciales de la producción de IFN-γ mediante TIL estimulados con ADT1-4-2 o ADT1-7-3 durante 72 horas en presencia de 50 ng/ml de IL-15. **(E)** Muestra que la estimulación de TIL con ADT-1-4-2 o ADT1-7-3 no mejoró la secreción de citocinas IL-6 o IL-17 asociadas al tipo 17 en este punto temporal. **(F, G)** Muestra el % de disminución en expresión de TCR Vδ1 en los linfocitos T γδ que infiltran tumores totales después de estimulación con mAb en 24 (F) o 72 (G) horas en dos donantes individuales, lo que confirma el acoplamiento de la diana en TIL aislados mediante digestión enzimática. **(H)** Muestra la expresión mejorada dependiente de la dosis de Ki67 en linfocitos T γδ después de 72 horas de estimulación con ADT1-4-2. **(I, J)** Muestra el aumento en

veces de IFN-γ producida por TIL aislados a partir de dos donantes individuales mediante digestión enzimática y estimulados con ADT1-4-2 en una concentración de 6,66 nM en presencia de 2 ng/ml de IL-15 a 24 (I) o 72 (J) horas. En todos los casos, la concentración del anti-RSV de control y ADT1-4 parental se empareja con la concentración más alta usada en el estudio (es decir, una concentración de 6,66 nM para A, C, F, G, H, I, J y una concentración de 66,6 nM para B y E).

Figura 21. Efecto de anticuerpos anti-Vδ1 sobre poblaciones de TIL de biopsias de tumores primarios. (A) Muestra la expresión mejorada de CD25 y Ki67 en linfocitos T γδ estimulados durante 10 días con ADT1-4-2. **(B)** Muestra un aumento sustancial en linfocitos T γδ granzima B^+ perforina$^+$ después de 10 días de estimulación con ADT1-4-2. **(C)** Muestra expresión considerablemente mejorada de granzima B y perforina por linfocitos T αβ $CD8^+$ y $CD8^-$ después de 10 días de estimulación de linfocitos T $V\delta1^+$ que infiltran tumores con ADT1-4-2. **(D)** Muestra producción significativamente aumentada de IFN-γ, y producción moderadamente aumentada de IL-17 y IL-6 por TIL derivados de tumor de pulmón después de estimulación con ADT1-4-2. **I** Demuestra la producción mejorada de las quimiocinas CCL2, CCL4 y CXCL10 mediante TIL después de 10 días de estimulación con ADT1-4-2. En todos los casos, anti-RSV de control y ADT1-4 parental coincidieron a la misma concentración que ADT1-4-2 con maduración de afinidad.

Figura 22: Secuencias de clones de linaje ADT1-4 (cadenas livianas)

Figura 23: Secuencias de clones de linaje ADT1-4 (cadenas pesadas).

Figura 24: Secuencias de clones de linaje ADT1-7 (cadenas livianas).

Figura 25: Secuencias de clones de linaje ADT1-7 (cadenas pesadas)

Figura 26: Los anticuerpos biespecíficos Vδ1/EGFR exhiben fijación de alta afinidad a EGFR humano y una afinidad de fijación a Vδ1 humano comparable con sus mAb parentales. **(A, B)** Se realizó análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) con variantes biespecíficas Vδ1/EGFR para evaluar la fijación a Vδ1 humano **(A)** y antígeno de EGFR humano **(B)**. Los mAb parentales, cetuximab y mAb de control negativo se incluyeron con fines de comparación.

Figura 27: El anticuerpo biespecífico Vδ1/EGFR se fija a células diana $EGFR^+$ A431 y linfocitos T γδ Vδ1 (A) Expresión en superficie celular de EGFR y Vδ1 en línea celular A431 y linfocitos T γδ Vδ1 primarios. **(B)** El nivel de fijación mediante anticuerpos biespecíficos Vδ1/EGFR a línea celular A431 o linfocitos T γδ Vδ1 primarios. Las células diana se tiñeron con concentraciones variables de anticuerpo, seguido de anticuerpo de detección de anti-IgG humana fluorescente. Todas las etapas de incubación se llevaron a cabo a 4 °C y la fijación de mAb se determinó mediante el uso de citometría de flujo para medir el nivel de mediana de fluorescencia. Las curvas de dosis-respuesta de cuatro parámetros logarítmicos se ajustaron mediante el uso de GraphPad Prism 9.

Figura 28: Los anticuerpos biespecíficos Vδ1/EGFR inducen activación y desgranulación de linfocitos T específicos de EGFR lo que genera citotoxicidad mediada por linfocitos T γδ aumentada de células dianas A431. (A) Expresión en superficie celular de TCR γδ en linfocitos T γδ Vδ1 primarios después de cultivo con anticuerpos biespecíficos durante 24 horas en presencia o ausencia de células A431. **(B, C)** La cantidad de células A431 viables (B) y estado de activación de linfocitos T γδ Vδ1 primarios después de cocultivo en una relación 1:1 junto con concentraciones variables de anticuerpo durante 24 horas. La viabilidad se midió mediante tinte de viabilidad y estado de activación con un anticuerpo CD25. **(D)** Desgranulación de linfocitos T γδ Vδ1 primarios después de cocultivo con células A431 en una relación 1:1 junto con concentraciones variables de anticuerpo durante cuatro horas. La desgranulación se determinó al agregar anticuerpo anti-CD107α conjugado con fluoróforo directamente en la mezcla de células-anticuerpo al inicio del cocultivo. **(E)** La cantidad de células A431 viables después de 24 horas de cocultivo con 10 pM de anticuerpo y cantidad variable de linfocitos T γδ Vδ1 primarios. (A-E) En todos los casos, la fluorescencia se determinó mediante el uso de citometría de flujo para medir el nivel de mediana de fluorescencia. Las curvas de dosis-respuesta de cuatro parámetros logarítmicos se ajustaron mediante el uso de GraphPad Prism 9. Los datos se representan como media ± SD de dos replicados biológicos

Figura 29: Evidencia adicional del no agotamiento y la regulación descendente de CD3 en linfocitos T Vδ1 tanto derivados de la sangre como asociados a tumores. **(A)** Muestra el MFI de TCR vδ1 tras la estimulación con anticuerpo como una indicación de acoplamiento de diana mAb en linfocitos T Vδ1 derivados de la sangre. **(B)** Muestra el MFI de expresión de CD3 en células vδ1 derivadas de la sangre reguladas positivamente. La estimulación con el anticuerpo vδ1 se acopló con células vδ1 y dio como resultado la regulación descendente de vδ1 y CD3 en células vδ1. **(C, D y E)** muestran los efectos de activación y no agotamiento conferidos a linfocitos T Vδ1 asociados a tumores con anticuerpos anti-Vδ1 de ejemplo.

Figura 30: El bioensayo indicador de ADCC no muestra ADCC como resultado de los anticuerpos anti-vδ1. Las células diana, es decir, células γδ, se incubaron con células efectoras de bioensayo de ADCC en presencia de anticuerpos anti-vδ1, anticuerpos anti-vδ1 LAGA (deshabilitado por Fc) y control de isotipo de RSV. La señal de luminiscencia se registró como unidades de luz relativa (RLU) y la inducción de cambio se calculó como se describe en los métodos. N=2 donantes de γδ (realizados en duplicados técnicos) para "anticuerpo anti-vδ1", "anticuerpo anti-vδ1 LAGA", "RSV", "OKT3". N=1 líneas de células Raji para la condición "Rituximab + Rajis" (en duplicados técnicos) y n=1 donantes de γδ para las condiciones "anticuerpo anti-vδ1 + efector" y "anticuerpo anti-vδ1 LAGA + efector" (se realizaron en duplicados técnicos y singlicato, respectivamente). Relación efector:diana de 3:1.

Figura 31: Mejora conferida por anticuerpo multiespecífico de la citotoxicidad mediada por células efectoras Vδ1+. El direccionamiento a un antígeno asociado a enfermedad centrada en tejido: **(A-D)** Ejemplo de cocultivo de células efectoras Vδ1+ con células cancerosas A-431 +/- anticuerpos multiespecíficos que comprenden porciones de fijación biespecífica anti-Vδ1 x anti-TAA (EGFR) en donde el dominio de fijación VL+VH anti-Vδ1 (a la primera diana) está emparejado con el dominio CH1-CH2-CH3 de una porción de fijación anti-EGFr (a la segunda diana). **(E-H)** Ejemplo de cocultivo de células efectoras Vδ1+ con células cancerosas A-431 +/- anticuerpos multiespecíficos que comprenden porciones de fijación biespecífica anti-Vδ1 x anti-TAA (EGFR) en donde el dominio de fijación anti-Vδ1 (a la primera diana) comprende un anticuerpo de longitud completa (VH-CH1-CH2-CH3/VL-CL) luego combinado con una porción de fijación a scFv derivado de cetuximab anti-EGFR (a la segunda diana). **(I-J)** Enfoque alternativo para representar los datos: Mejora de porcentaje conferida por anticuerpos multiespecíficos sobre la citotoxicidad de las células efectoras Vδ1+ hacia células EGFR+ en comparación con las partes componentes.

Figura 32: Secuencias de dominios de fijación a EGFR (IgG1 CH1-CH2-CH3) que muestran los cambios y alineaciones de secuencia a IgG1 CH3 (numeración EU).

Figura 33: Una tabla que muestra la numeración de residuos CH3 con referencia cruzada. La tabla se adapta a partir de IMGT.org. Las posiciones de los aminoácidos modificados según las numeraciones IMGT (estándar), IMGT (exón), EU y Kabat a las que se hace referencia en otra parte de la presente se resaltan mediante sombreado. Obsérvese una nomenclatura de posición necesaria pero poco convencional para describir la inserción de aminoácido adicional encontrada en un ejemplo. También se indica el constructo de fijación a EGFR. Ver más adelante la posición 21.1 (columna de IMGT exón) / 361.1 (columna de EU) / 384.1 (columna de Kabat) / 17.1 (columna de IMGT estándar).

Figura 34: Evaluación de la capacidad de elaboración/estabilidad de anticuerpos multiespecíficos Vδ1xEGFR: Estudios de expresión y analíticos en seis moléculas. (A) Rendimientos en CHO. **(B)** Estabilidad en condiciones de almacenamiento acelerado. **(C)** Propensión a la agregación. **(D)** Perfil de descomposición en condiciones aceleradas (análisis no reducido). **(E)** Perfil de descomposición en condiciones aceleradas (análisis reducido). **(F)** Resumen general/conclusión

Figura 35: Un estudio extendido sobre los anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR y los diferentes efectos otorgados por aumentar/disminuir la afinidad en el brazo de fijación a VD1. (A) Resumen de afinidad. **(B) (C)** Impacto sobre la fijación multiespecífica a células Vδ1+ que residen en el tejido. **(D)(E)** Impacto sobre la internalización de TCR Vδ1 de células Vδ1+ que residen en el tejido. **(F)(G)** Impacto sobre la desgranulación de células Vδ1+ que residen en el

tejido. **(H)(I)** Impacto sobre la función citolítica multiespecífica hacia células cancerosas EGFR+. **(J)(K)** Impacto sobre la proliferación de células Vδ1+ que residen en el tejido. **(L)** Resumen general de este estudio. **(M)** Impacto de la cantidad de copias de TAA.

Figura 36: Un estudio extendido sobre los anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR y los diferentes efectos otorgados por aumentar/disminuir la afinidad en el brazo de fijación a EGFR. (A) Resumen de afinidad. **(B)(C)** Impacto sobre la fijación multiespecífica a la línea celular de cáncer de colon EGFR+ HT-29. **(D)(E)** Impacto sobre la regulación descendente de TCR Vδ1 de células Vδ1+ que residen en el tejido. **(F)(G)** Impacto sobre la desgranulación de células Vδ1+ que residen en el tejido. **(H)(I)** Impacto sobre el estado de activación de 41BB de células Vδ1+ que residen en el tejido. **(J)(K)** Impacto sobre la función citolítica multiespecífica hacia células cancerosas EGFR+. **(L)(M)** Impacto sobre la proliferación de células Vδ1+ que residen en el tejido. **(N)** Afinidad con EGFR e impacto de la cantidad de copias de TAA de las células cancerosas.

Figura 37: Impacto de la afinidad sobre la fijación preferencial a Vδ1 en comparación con las células EGFR. Impacto de la afinidad sobre la fijación preferencial a Vδ1 en comparación con las células EGFR como un gráfico de barras **(A)**, tabla **(B)** y relación **(C)**.

Figura 38: Impacto de la afinidad con EGFR sobre la internalización del anticuerpo multiespecífico por parte de las células tumorales A431. (A)(B) Afinidad con EGFR; impacto sobre la internalización del anticuerpo multiespecífico por parte de las células tumorales A431. **(C)(D)** Impacto sobre la depuración multiespecífica por parte de las células tumorales A431.

Figura 39: Impacto de la afinidad con EGFR sobre la inhibición generada por el anticuerpo multiespecífico de la fijación al ligando de EGF y la proliferación de células tumorales. (A)(B) Impacto de la afinidad con EGFR sobre la inhibición generada por el anticuerpo multiespecífico de la fijación al ligando de EGF y la proliferación de células tumorales. **(C)(D)** Impacto de la afinidad con EGFR sobre la inhibición multiespecífica de la proliferación de células tumorales EGFR+.

Figura 40: Anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR: Preservación de células EGFR+ sanas. (A)(C) Efectos de titulación de dosis presentados. **(B)** Imágenes de microscopía representativas del experimento descrito en (A).

Figura 41: Anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR: Comparación de ADT1-4-2xFS1-67 con ADT1-4xFS1-67 "parental" con menor afinidad (alias G04 FS1-67). (**A)** Regulación descendente de TCR – Comparación de la respuesta a la dosis de ADT1-4-2xFS1-67 con ADT1-4xFS1-67. **(B)** Comparación de la regulación descendente de TCR – Resumen de los resultados.

Figura 42: Anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR: Comparación con un anticuerpo multiespecífico CD3xEGFR. **(A)(B)(C)** Impacto del receptor diana de linfocitos T sobre la regulación descendente de CD3ε y TCR Vδ1. **(D)(E)** Impacto sobre la función citolítica

multiespecífica hacia células cancerosas EGFR+. **(F)(G)** Impacto sobre la secreción inducida de citocinas por linfocitos T activados. **(H)(I)** Impacto sobre la proliferación de células Vδ1+ que residen en el tejido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona anticuerpos multiespecíficos y fragmentos y variantes de estos que se fijan específicamente al receptor de linfocitos T de linfocitos T gamma delta, y que se fijan específicamente a EGFR.

Más específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos con alta afinidad que comprenden múltiples sitios de fijación al antígeno, incluso un sitio de fijación al antígeno para variable delta 1 (Vδ1) de TCR y un sitio de fijación al antígeno para EGFR ("anticuerpos multiespecíficos").

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención están en formato mAb^2 y comprenden una región Fc que se diseñó por ingeniería genética para contener bucles de fijación al antígeno en su dominio CH3. Esta región Fc modificada se denomina "Fcab". El anticuerpo mAb^2 comprende además una región Fab, que comprende un par de dominios VH-VL que proporciona un sitio de fijación al antígeno. Las moléculas mAb^2 de la presente invención comprenden una Fcab de fijación a EGFR y una Fab de fijación a vδ1.

Más específicamente, la presente invención se refiere a la provisión y caracterización de anticuerpos multiespecíficos optimizados, por ejemplo, anticuerpos preparados de acuerdo con un procedimiento de selección optimizado a partir de anticuerpos anti-Vδ1 parentales, tales como los anticuerpos parentales denominados en la presente G04, E07, C08, B07, C05, E04, F07, G06, G09, B09, G10 y E01. En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos optimizados derivados de G04 y E07.

Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el significado que les otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio al cual pertenece la invención. Como se usa en la presente, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a continuación.

Los linfocitos T gamma delta (γδ) representan un subconjunto pequeño de linfocitos T que expresan en su superficie un receptor de linfocitos T (TCR) distinto que los define. Este TCR está formado por una cadena gamma (γ) y una cadena delta (δ). Cada cadena contiene una región variable (V), una región constante (C), una región transmembrana y una cola citoplasmática. La región V contiene un sitio de fijación al antígeno. Existen dos subtipos principales de linfocitos T γδ humanos: uno que es dominante en la sangre periférica y uno que es dominante en tejidos no hematopoyéticos. Los dos subtipos pueden ser definidos por el tipo de δ y/o γ presente en las

células. Por ejemplo, los linfocitos T γδ que son dominantes en sangre periférica expresan principalmente la cadena variable delta 2 (Vδ2). Los linfocitos T γδ que son dominantes en tejidos no hematopoyéticos (es decir, que residen en el tejido) expresan principalmente la cadena variable delta 1. Las referencias a "**linfocitos T Vδ1**" o **"linfocitos T Vδ1+**" se refieren a linfocitos T γδ con una cadena Vδ1, es decir, células $Vδ1^+$.

Las referencias a "**variable delta 1"** también se pueden denominar Vδ1 o Vd1, mientras que un nucleótido que codifica una cadena TCR que contiene esta región o el complejo de proteína de TCR que comprende esta región puede denominarse "TRDV1". Los anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que interactúan con la cadena Vδ1 de un TCR γδ, y también interactúan con EGFR, son todos efectivamente anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que se fijan a Vδ1 y pueden denominarse "anticuerpos anti-variable delta 1 de TCR o fragmentos de fijación al antígeno de estos" o "anticuerpos anti-Vδ1 o fragmentos de fijación al antígeno de estos" o "anticuerpos anti-TRDV1 o fragmentos de fijación al antígeno de estos" o "anticuerpos anti-Vδ1xEGFR o fragmentos de fijación al antígeno de estos".

En la presente, se hacen referencias adicionales a otras cadenas delta tales como la cadena "**variable delta 2**". Estos pueden denominarse de manera similar. Por ejemplo, las cadenas variables delta 2 se pueden denominar Vδ2, mientras que un nucleótido que codifica una cadena TCR que contiene esta región o el complejo de proteína de TCR que comprende esta región puede denominarse "TRDV2". En formas de realización preferidas, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que interactúan con la cadena Vδ1 de un TCR γδ no interactúan con otras cadenas delta tales como Vδ2. En la invención, los anticuerpos son específicos para TRDV1 y no se fijan a TRDV2 (SEQ ID NO: 310) u otros antígenos presentes en un receptor de linfocitos T gamma delta, tal como TRDV3 (SEQ ID NO: 311).

En la presente, también se hacen referencias a "**cadenas variables gamma**". Estas pueden denominarse cadenas γ o Vγ, mientras que un nucleótido que codifica una cadena TCR que contiene esta región o el complejo de proteínas de TCR que comprende esta región puede denominarse TRGV. Por ejemplo, TRGV4 se refiere a una cadena Vγ4. En una forma de realización preferida, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que interactúan con la cadena Vδ1 de un TCR γδ no interactúan con cadenas gamma tales como Vγ4 (por ejemplo, SEQ ID NO: 309). Los anticuerpos tampoco se fijan o interactúan con otros dominios encontrados dentro de un TCR γδ, tal como TRDJ, TRDC, TRGJ o TRGC

La expresión "**complejo de receptor de linfocitos T**" es el complejo de proteínas que comprenden el "receptor de linfocitos T" (o "TCR") encontrado en la superficie de linfocitos T responsable de reconocer una variedad de antígenos. El complejo del receptor de linfocitos T

comprende las cadenas alfa y beta del receptor de linfocitos T, o en el caso de linfocitos T gamma delta, las cadenas gamma y delta del receptor de linfocitos T, y hasta 6 o más cadenas adicionales, tales como CD3δ, CD3γ, CD3ε y CD3ζ, aunque la formación precisa de los complejos del receptor de linfocitos T puede variar. El complejo del receptor de linfocitos T media la señalización intracelular en el linfocito T, lo que puede llevar a la activación de linfocitos T.

El término "**anticuerpo**" incluye cualquier constructo de proteína de anticuerpo que comprende al menos un dominio variable de anticuerpo que comprende al menos un sitio de fijación al antígeno (ABS). Los anticuerpos incluyen, entre otros, inmunoglobulinas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como los subtipos de estas). La estructura general de anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) ensamblados a partir de dos polipéptidos de cadena pesada (H) idénticos y dos polipéptidos de cadena liviana (L) idénticos está bien establecida y altamente conservada en mamíferos (Padlan (1994) *Mol. Immunol.* 31:169-217).

Un anticuerpo o inmunoglobulina (Ig) convencional es una proteína que comprende cuatro cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L). Cada cadena se divide en una región constante y un dominio variable. Los dominios variables de cadena pesada (H) se abrevian en la presente como VH, y los dominios variables de cadena liviana (L) se abrevian en la presente como VL. Estos dominios, los dominios relacionados a estos y los dominios derivados de estos, pueden denominarse en la presente dominios variables de cadena de inmunoglobulina. Los dominios VH VL (también denominados regiones VH y VL) pueden subdividirse además en regiones, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones de marco" ("FR"). Las regiones de marco y determinantes de la complementariedad se definieron precisamente (Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, *quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services*, (1991) número de publicación de NIH 91-3242). También existen convenciones alternativas de numeración para secuencias de CDR, por ejemplo, las establecidas en Chothia *et al.* (1989) Nature 342: 877-883 o como se resumen en IMGT.org. En un anticuerpo convencional, cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El tetrámero de anticuerpo convencional de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina livianas está formado con las cadenas de inmunoglobulina pesadas y livianas interconectadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro, y las cadenas pesadas conectadas de manera similar. Por lo tanto, el anticuerpo completo comprende dos Fab, y cada Fab comprende un par de dominios VH-VL. La región constante de cadena pesada incluye tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena liviana está compuesta de un dominio, CL. El dominio variable de

las cadenas pesadas y el dominio variable de las cadenas livianas son dominios de fijación que interactúan con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos en general median la fijación del anticuerpo para alojar tejidos o factores, incluso diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

"**Numeración EU**" se refiere a una convención de numeración usada para la numeración de residuos de aminoácidos en anticuerpos. A cada residuo del anticuerpo se le asigna un número para permitir la comparación de los anticuerpos. Cuando un anticuerpo variante contiene un residuo que no estaba presente en el anticuerpo de tipo silvestre (por ejemplo, una mutación de inserción), se usan decimales para indicar la inserción. Por ejemplo, si se insertó un residuo entre los residuos designados con los números 361 y 362, el nuevo residuo recibiría el número EU 361.1. La numeración EU es un esquema alternativo de numeración distinto de otros tales como Kabat (Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, *quinta edición*, *U.S. Department of Health and Human Services*, (1991) número de publicación de NIH 91-3242). Chothia (Chothia *et al.* (1989) Nature 342: 877-883) o como resume IMGT.org. en donde la numeración EU se presenta con una referencia cruzada adicional a Edelman, G.M. *et al*., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969). (10.1073/pnas.63.1.78). La Figura 33 muestra la correspondencia entre la numeración EU, la numeración IMGT y la numeración Kabat para los residuos del dominio CH3. La Figura 32 muestra cómo los residuos de los anticuerpos multiespecíficos de la invención se numeran de acuerdo con el esquema de numeración EU.

Como se usa en la presente, una "**región Fab**" se refiere a una porción de un anticuerpo (o constructos que contienen dicha porción) que comprende un par de dominios VH-VL que proporciona un sitio de fijación al antígeno (también denominado sitio de fijación al antígeno a base de CDR). La región Fab puede comprender además los dominios CL y CH1. Un anticuerpo convencional con dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas comprende por ende dos Fab, y cada Fab comprende un par de dominios VH-VL.

Como se usa en la presente, una "**región Fc**" (región cristalizable del fragmento) se refiere a una porción de un anticuerpo (o constructos que contienen dicha porción) que comprende los dominios CH2 y CH3. La región Fc es la región del terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluso regiones Fc de secuencia de tipo silvestre y regiones Fc modificadas. Una región Fc es dimérica y comprende por ende regiones constantes de la cadena pesada apareadas, en donde cada una comprende un dominio CH2 y CH3.

Un "**fragmento**" del anticuerpo (que también puede denominarse "fragmento de anticuerpo", "fragmento de inmunoglobulina", "fragmento de fijación al antígeno" o "polipéptido de fijación al antígeno"), como se usa en la presente, se refiere a una porción de un anticuerpo (o

constructos que contienen dicha porción) que se fija específicamente a la primera diana, la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T γδ o la segunda diana, EGFR (por ejemplo, una molécula en la que una o más cadenas de inmunoglobulina no es de longitud completa, pero que se fija específicamente a la diana). Ejemplos de fragmentos de fijación abarcados dentro de la expresión fragmento de anticuerpo incluyen:

(i) un fragmento Fab (un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1);

(ii) un fragmento F(ab')2 (un fragmento bivalente que consiste en dos fragmentos Fab ligados mediante un puente disulfuro en la región bisagra);

(iii) un fragmento Fd (que consiste en los dominios VH y CH1);

(iv) un fragmento Fv (que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo);

(v) un fragmento variable monocatenario, scFv (que consiste en los dominios VL y VH unidos, mediante el uso de métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que les permite formarse como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes);

(vi) un VH (un dominio variable de cadena de inmunoglobulina que consiste en un dominio VH);

(vii) un VL (un dominio variable de cadena de inmunoglobulina que consiste en un dominio VL);

(viii) un anticuerpo de dominio (dAb, que consiste en el dominio VH o el dominio VL);

(ix) un minicuerpo (que consiste en un par de fragmentos scFv que están ligados a través de dominios CH3); y

(x) un diacuerpo (que consiste en un dímero no covalente de fragmentos scFv que consisten en un dominio VH de un anticuerpo conectado mediante un ligador de péptido pequeño a un dominio VL de otro anticuerpo)

(xi) un fragmento Fc (que consiste en los dominios CH2 y CH3)

(xii) un fragmento Fcab (que consiste en un fragmento Fc que se diseñó por ingeniería genética para contener bucles de fijación al antígeno en su dominio CH3)

(xiii) un dominio CH3 de fijación al antígeno de una Fcab.

"**Anticuerpo humano**" se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los sujetos humanos a los que se administraron dichos anticuerpos humanos no generaron respuestas de anticuerpos de especies cruzadas (por ejemplo, denominadas respuestas HAMA, anticuerpo humano-anti-ratón) a los aminoácidos primarios contenidos dentro de dichos anticuerpos. Dichos anticuerpos humanos

pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio o mediante mutación somática), por ejemplo, en las CDR y, en particular, en CDR3. Sin embargo, el término no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, se injertaron en secuencias de marco humanas. Los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como los anticuerpos expresados mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, los anticuerpos aislados de una colección de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que involucra el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN, también se pueden denominar "**anticuerpos humanos recombinantes**".

La sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la región de marco de un dominio variable de inmunoglobulina no humana con el residuo correspondiente de un dominio variable humano se denomina "**humanización**". La humanización de un dominio variable puede reducir la inmunogenicidad en seres humanos.

"**Especificidad**" se refiere a la cantidad de tipos diferentes de antígenos o determinantes antigénicos a los cuales un anticuerpo particular o fragmento de fijación al antígeno de este se puede fijar. La especificidad de un anticuerpo es la capacidad del anticuerpo para reconocer un antígeno particular como una entidad molecular única y distinguirlo de otro. Un anticuerpo que "se fija específicamente" a un antígeno o un epítopo (o que es "específico" para un antígeno o epítopo) es una expresión bien entendida en la técnica. Se dice que una molécula exhibe "fijación específica" si reacciona más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con un antígeno o epítopo diana particular, que con dianas alternativas. Un anticuerpo "se fija específicamente" a un antígeno o epítopo diana si se fija con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de la que se fija a otras sustancias.

Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos multiespecíficos. Un "**anticuerpo multiespecífico**" es un anticuerpo que puede fijarse a una pluralidad de epítopos diferentes de manera simultánea o secuencial. En general, los epítopos no estarán en el mismo antígeno. Por lo tanto, un anticuerpo multiespecífico tiene la capacidad de fijarse selectivamente a epítopos presentes en diferentes antígenos a través de una pluralidad de dominios de fijación diferentes. Esto contrasta con los anticuerpos monoespecíficos convencionales que no tienen esta capacidad. En cambio, un "**anticuerpo monoespecífico**" solo tiene especificidad de fijación para un antígeno, aunque pueden tener múltiples sitios de fijación para ese antígeno (por ejemplo, la valencia de un

anticuerpo IgG humano completo es 2, y la valencia de otros anticuerpos puede ser mayor, pero si el anticuerpo solo reconoce un antígeno, aun se clasifica como un anticuerpo monoespecífico). Por lo tanto, los anticuerpos multiespecíficos de la invención se fijan a múltiples antígenos diferentes de manera simultánea y/o secuencial.

En algunas formas de realización de la invención, los anticuerpos son anticuerpos biespecíficos. Un "**anticuerpo biespecífico**" es un anticuerpo que puede fijarse a dos epítopos diferentes de manera simultánea y/o secuencial. En general, los epítopos no estarán en el mismo antígeno. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos tienen la capacidad de fijarse selectivamente a dos epítopos diferentes presentes en dos antígenos diferentes a través de dos dominios de fijación diferentes. Esto contrasta con los anticuerpos monoespecíficos convencionales que no tienen esta capacidad. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos de la invención se fijan a dos antígenos diferentes de manera simultánea y/o secuencial.

Como se usa en la presente, "**anticuerpo mAb^{2}**" o "**anticuerpo mAb al cuadrado**" se refiere a un formato de anticuerpo biespecífico de acuerdo con el cual los anticuerpos biespecíficos comprenden una región Fc diseñada por ingeniería genética para contener bucles de fijación al antígeno en su dominio CH3. Esta región Fc modificada se denomina "**Fcab**". El anticuerpo mAb^{2} comprende además una región Fab, que comprende un par de dominios VH-VL que proporciona un sitio de fijación al antígeno.

El **dominio CH3** de IgG1 humana comienza en el residuo número 341 y finaliza en el residuo número 447 (numeración EU). El residuo número 447 (numeración EU) a veces se escinde durante la elaboración por lo que no siempre aparece en la molécula final. El dominio CH3 de IgG1 humana (SEQ ID NO: 563) comprende dos láminas ß formadas por tres y cuatro cadenas ß, respectivamente. Tres bucles estructurales conectan estas cadenas ß en el terminal C del dominio CH3. En los anticuerpos de la presente invención, estos bucles se modificaron para formar el sitio de fijación a EGFR. Los residuos 355 a 362 se definieron como el bucle que conecta las cadenas A y B del dominio CH3 "**bucle AB**", los residuos 383 a 391 como el bucle que conecta las cadenas C y D del dominio CH3 "**bucle CD**" y los residuos 413 a 422 como el bucle que conecta las cadenas E y F del dominio CH3 "**bucle EF**". Se usa la numeración EU (ver la Figura 32).

"**Afinidad**", representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un polipéptido de fijación al antígeno (KD), es una medida de la fuerza de fijación entre una determinante antigénica y un sitio de fijación al antígeno en el anticuerpo (o fragmento de fijación al antígeno de este): a menor valor de KD, mayor la fuerza de fijación entre un determinante antigénico y el polipéptido de fijación al antígeno. Alternativamente, la afinidad también se puede expresar como la constante de afinidad (KA), que es 1/KD. La afinidad se puede determinar con métodos conocidos, en función del antígeno específico de interés. Por ejemplo. KD se puede

determinar mediante resonancia de plasmones superficiales.

Cualquier valor de KD menor de 10^{-6} se considera indicativo de fijación. La fijación específica de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, a un antígeno o determinante antigénico se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida, que incluye, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de fijación competitivos, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competencia tipo sándwich, diálisis de equilibrio, fijación de equilibrio, filtración de gel, ELISA, resonancia de plasmones superficiales o espectroscopía (por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de fluorescencia) y las diferentes variantes de estos conocidas en la técnica.

"**Avidez**" es la medida de la fuerza de fijación entre un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, y el antígeno pertinente. La avidez se relaciona tanto a la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de fijación al antígeno en el anticuerpo como a la cantidad de sitios de fijación pertinentes presentes en el anticuerpo.

"***In situ***" significa en el lugar natural u original, en lugar de ser movido a otro lugar. Por ejemplo, una célula Vδ1+ *in situ* en un paciente se refiere a una célula vδ1 *in vivo*, a diferencia de una célula *in vitro* o *ex vivo*.

"**Células Vδ1+ de tejido humano**" y "**células Vδ1+ hematopoyéticas y de sangre**" y "**células Vδ1+ de linfocitos que infiltran tumores (TIL)"** se definen como células Vδ1+ contenidas en o derivadas de tejido humano o del sistema sanguíneo hematopoyético o de tumores humanos, respectivamente. Todos los tipos celulares mencionados se pueden identificar por su (i) ubicación o de dónde se derivan y (ii) su expresión de los TCR Vδ1+.

"**Anticuerpos moduladores**" son anticuerpos que confieren un cambio medible que incluye, entre otros, un cambio medible en ciclo celular y/o en cantidad de células y/o viabilidad celular y/o en uno o más marcadores de superficie celular y/o en la secreción de una o más moléculas secretoras (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, leucotrienos, etc.) y/o una función (tal como citotoxicidad hacia una célula diana o célula enferma), al entrar en contacto con o fijarse a una célula que expresa la diana a la cual se fija el anticuerpo. Un método para "modular" una célula, o población de estas, se refiere a un método en donde al menos un cambio medible en dicha célula o células, o secreción de estas, se activa para generar una o más "células moduladas".

Una "**respuesta inmunitaria**" es un cambio medible en al menos una célula, o un tipo de célula, o una vía endocrina, o una vía exocrina, del sistema inmunitario (que incluye, entre otros, una respuesta mediada por células, una respuesta humoral, una respuesta de citocinas, una respuesta de quimiocinas) tras la adición de un anticuerpo modulador.

Una "**célula inmunitaria**" se define como una célula del sistema inmunitario que incluye,

entre otros, células CD34+, linfocitos B, células CD45+ (antígeno común de linfocitos), linfocitos T alfa-Beta, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T auxiliares, células plasmáticas, neutrófilos, monocitos, macrófagos, glóbulos rojos, plaquetas, células dendríticas, fagocitos, granulocitos, células linfoides innatas, células *Natural Killer* (NK) y linfocitos T gamma delta. En general, las células inmunitarias se clasifican con ayuda de análisis de moléculas de superficie celular de combinación (por ejemplo, a través de citometría de flujo) para identificar o agrupar para diferenciar células inmunitarias en subpoblaciones. Estas pueden subdividirse adicionalmente con análisis adicional. Por ejemplo, los linfocitos CD45+ pueden subdividirse adicionalmente en poblaciones vδ positivas y poblaciones vδ negativas.

"**Sistemas modelo**" son modelos biológicos o representaciones biológicas diseñadas para auxiliar en la compresión de cómo un medicamento tal como un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este pueden funcionar como un medicamento en la mejora de un signo o síntoma de enfermedad. Tales modelos incluyen por lo general el uso de células enfermas, células no enfermas, células sanas, células efectoras y tejidos, etc. *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, y en los que el rendimiento de dichos medicamentos se estudia y compara.

Las "**células enfermas**" exhiben un fenotipo asociado con la progresión de una enfermedad, tal como un tipo de cáncer, una infección tal como una infección viral, o una afección inflamatoria o enfermedad inflamatoria. Por ejemplo, una célula enferma puede ser una célula tumoral, una célula de tejido autoinmunitario o una célula infectada viralmente. En consecuencia, dichas células enfermas pueden definirse como tumorales, o infectadas viralmente, o inflamatorias.

"**Células sanas**" se refiere a células normales que no están enfermas. También se pueden denominar células "**normales**" o "**no enfermas**". Las células no enfermas incluyen células no cancerosas, no infectadas o no inflamatorias. Dichas células se emplean a menudo junto con células enfermas relevantes para determinar la especificidad para la célula enferma conferida por un medicamento y/o para comprender mejor el índice terapéutico de un medicamento.

"**Especificidad para células enfermas**" es una medida de cuán efectiva es una célula efectora o población de estas (tal como, por ejemplo, una población de células Vδ1+) es para distinguir e inactivar células enfermas, tal como células cancerosas, mientras preserva células no enfermas o sanas. Este potencial se puede medir en sistemas modelo y puede involucrar comparar la propensión de una célula efectora, o una población de células efectoras, para inactivar selectivamente o lisar células enfermas en comparación con el potencial de dichas células efectoras para inactivar o lisar células no enfermas o sanas. Dicha especificidad para células enfermas puede informar el índice terapéutico potencial de un medicamento.

"**Especificidad mejorada para células enfermas**" describe un fenotipo de una célula efectora tal como, por ejemplo, una célula Vδ1+, o población de esta, que fue modulado para

aumentar adicionalmente su capacidad para inactivar específicamente células enfermas. Esta mejora se puede medir en una variedad de maneras que incluyen relación de cambio o aumento de porcentaje, en especificidad o selectividad de inactivación de células enfermas.

"**ADCC**" o "**citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos**" describe una respuesta inmunitaria contra células recubiertas con anticuerpos fijados a los antígenos de superficie de la célula. Es un proceso mediado por células, mientras que una célula efectora inmunitaria (tal como célula NK, por ejemplo) reconoce anticuerpos fijados a la célula, lo que activa la desgranulación y lisis de la célula diana. En general, esto es mediado por interacciones de Fc-Fcγ. La región de Fc de anticuerpo fijado por células recluta células efectoras que expresan receptores de Fcγ (por ejemplo, células NK), lo que genera la desgranulación de la célula efectora y la muerte de la célula diana.

"**Habilitación por Fc**" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc funcional (región cristalizable del fragmento), es decir, una región Fc que no fue deshabilitada mediante mutación o de otra forma. Los anticuerpos habilitados por Fc demuestran función de Fc no atenuada. El anticuerpo habilitado por Fc puede comprender una secuencia de cadena pesada IGHC humana según se enumera en IMGT que no fue modificada o modificada mediante ingeniería genética o construida para reducir la fijación a uno o más receptores gamma de Fc. Por ejemplo, a través de mutación de bisagra de IGHC o mediante construcción de un anticuerpo que comprende dominios constantes de cadena pesada que son quiméricos o híbridos para secuencias de IGHC de IgG1/IgG2A o IgG1/IgG4.

Adecuadamente, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este (es decir, polipéptido) de la invención está aislado. Un polipéptido "**aislado**" es uno retirado de su entorno original. El término "aislado" se puede usar para referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se fija específicamente a Vδ1, o un fragmento de este, está sustancialmente libre de anticuerpos que se fijan específicamente a antígenos que no son Vδ1). El término "aislado" también se puede usar para referirse a preparaciones donde el anticuerpo aislado es suficientemente puro para ser administrado terapéuticamente cuando se formula como un ingrediente activo de una composición farmacéutica, o al menos 70-80 % (p/p) puro, con mayor preferencia, al menos 80-90 % (p/p) puro, aun con mayor preferencia, 90-95 % puro; y, con máxima preferencia, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (p/p) puro.

Adecuadamente, los polinucleótidos usados en la presente invención están aislados. Un polinucleótido "aislado" es uno que se retira de su entorno original. Por ejemplo, un polinucleótido aislado se aísla si se lo separa de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Se considera que un polinucleótido está aislado, por ejemplo, si está clonado en un vector

que no es parte de su entorno natural o si está comprendido dentro de cADN.

El anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este puede ser una "**variante funcionalmente activa**" que también incluye variantes alélicas naturales, así como mutantes o cualquier otra variante no natural. Como se sabe en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli)péptido que se caracteriza por tener una sustitución, eliminación o adición de uno o más aminoácidos que no alterna esencialmente la función biológica del polipéptido. A modo de ejemplo no limitativo, dichas variantes funcionalmente activas pueden funcionar cuando los marcos que contienen las CDR están modificadas, cuando las mismas CDR están modificadas, cuando dichas CDR están injertadas en marcos alternativos, o cuando se incorporan extensiones del terminal N o C. Además, los dominios de fijación que contienen CDR se pueden emparejar con cadenas de componentes diferentes tales como las compartidas con otro anticuerpo. Tras compartir con las denominadas cadenas pesadas 'comunes' o livianas 'comunes', dichos dominios de fijación aún pueden funcionar. Además, dichos dominios de fijación pueden funcionar cuando se multimerizan. Además, 'anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos' también pueden comprender variantes funcionales en donde las VH o VL o los dominios constantes se modificaron para alejarse o acercarse a secuencias canónicas diferentes (por ejemplo, como se enumera en IMGT.org) y que aun funcionan.

Para los fines de comparación de dos secuencias de polipéptidos cercanamente relacionados, el "**% de identidad de secuencia**" entre una primera secuencia de polipéptido y una segunda secuencia de polipéptido se puede calcular mediante el uso de NCBI BLAST v2.0, con el uso de ajustes estándar para secuencias de polipéptidos (BLASTP). Para los fines de comparación de dos secuencias de polinucleótidos cercanamente relacionados, el "% de identidad de secuencia" entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos se puede calcular mediante el uso de NCBI BLAST v2.0, con el uso de ajustes estándar para secuencias de nucleótidos polipéptidos (BLASTN).

Se considera que las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son iguales o "**idénticas**" a otras secuencias de polipéptidos o polinucleótidos si comparten 100 % de identidad de secuencia en toda su longitud. Los residuos en secuencias se numeran de izquierda a derecha, es decir, del terminal N al C en el caso de polipéptidos; del terminal 5’ al 3’ en el caso de polinucleótidos.

En algunas formas de realización, cualquier % de identidad de secuencia especificado de una secuencia se calcula sin las secuencias de todas las 6 CDR del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este puede comprender una secuencia de región de cadena pesada variable que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al

menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de una secuencia de región de cadena pesada variable especificada y/o una secuencia de región de cadena liviana variable que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de región de cadena liviana variable específica, en donde cualquier variación de aminoácidos tiene lugar solo en las regiones de marco de las secuencias de regiones de cadena pesada y liviana variable. En dichas formas de realización, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este que tienen ciertas identidades de secuencia retienen las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y liviana completas del anticuerpo anti-Vδ1 correspondiente o fragmento de fijación al antígeno de este. En un ejemplo más específico, aunque sin ser limitante y solo para ilustrar adicionalmente estas formas de realización de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, en donde cualquier variación de aminoácidos tiene lugar solo en las regiones de marco de las secuencias de región de cadena pesada y liviana variables. Por lo tanto, el anticuerpo en este ejemplo específico comprende además una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95.

Además, los anticuerpos multiespecíficos que se proporcionan en la presente pueden comprender una secuencia variable de la cadena liviana kappa y retener un residuo de aminoácido en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT que no es serina, por ejemplo, un residuo no polar y/o que no es de la línea germinal humana, por ejemplo, pueden comprender un residuo de leucina en esta posición. Por ejemplo, aunque sin ser limitante y solo para ilustrar adicionalmente estas formas de realización de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, en donde cualquier variación de aminoácidos tiene lugar solo en las regiones de marco de las secuencias de región de

cadena pesada y liviana variables, y en donde el anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena liviana kappa que comprende un residuo de aminoácido en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT que no es de la línea germinal humana y/o no es polar (por ejemplo, un residuo de leucina en esta posición). El anticuerpo de este ejemplo específico comprende además una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95.

Una "**diferencia**" entre secuencias se refiere a una inserción, eliminación o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición de la segunda secuencia, en comparación con la primera secuencia. Dos secuencias de polipéptidos pueden contener una, dos o más de dichas diferencias de aminoácidos. Las inserciones, eliminaciones o sustituciones en una segunda secuencia que por lo demás idéntica (100 % de identidad de secuencia) a una primera secuencia dan como resultado un % de identidad de secuencia reducido. Por ejemplo, si las secuencias idénticas tienen una longitud de 9 residuos de aminoácidos, una sustitución en la segunda secuencia da como resultado una identidad de secuencia de 88,9 %. Si las secuencias de polipéptidos primera y segunda tienen una longitud de 9 residuos de aminoácidos y comparten 6 residuos idénticos, las secuencias de polipéptidos primera y segunda comparten más de 66 % de identidad (las secuencias de polipéptidos primera y segunda comparten 66,7 % de identidad).

Alternativamente, a los fines de comparar una primera secuencia de polipéptidos de referencia con una segunda secuencia de polipéptidos comparativa, se puede determinar la cantidad de adiciones, sustituciones y/o eliminaciones hechas a la primera secuencia para producir la segunda secuencia. Una "**adición**" es la adición de un residuo de aminoácido en la secuencia del primer polipéptido (que incluye adición en cualquier terminal del primer polipéptido). Una "**sustitución**" es la sustitución de un residuo de aminoácido en la secuencia del primer polipéptido con un residuo de aminoácido diferente. Dicha sustitución puede ser conservadora o no conservadora. Una "**eliminación**" es la eliminación de un residuo de aminoácido de la secuencia del primer polipéptido (que incluye eliminación en cualquier terminal del primer polipéptido).

Mediante el uso de los códigos de tres letras y una letra, los aminoácidos naturales se pueden denominar de la siguiente manera: glicina (G o Gly), alanina (A o Ala), valina (V o Val), leucina (L o Leu), isoleucina (I o Ile), prolina (P o Pro), fenilalanina (F o Phe), tirosina (Y o Tyr), triptófano (W o Trp), lisina (K o Lys), arginina (R o Arg), histidina (H o His), ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu), asparagina (N o Asn), glutamina (Q o Gln), cisteína (C o Cys),

metionina (M o Met), serina (S o Ser) y treonina (T o Thr). Cuando un residuo puede ser ácido aspártico o asparagina, se pueden usar los símbolos Asx o B. Cuando un residuo puede ser cualquier aminoácido, se pueden usar los símbolos Xaa o X. Cuando un residuo puede ser ácido glutámico o glutamina, se pueden usar los símbolos Glx o Z. Las referencias a ácido aspártico incluyen aspartato, y ácido glutámico incluye glutamato, a menos que el contexto especifique lo contrario.

Como se usa en la presente, la numeración de secuencias de polipéptidos y las definiciones de CDR y FR se definen de acuerdo con el sistema de numeración de EU y/o IMGT, como se indica en contexto. Un residuo de aminoácidos "**correspondiente**" entre una primera y segunda secuencia de polipéptidos es un residuo de aminoácidos en una primera afinidad de secuencia que comparte la misma posición de acuerdo con el sistema de numeración de EU y/o IMGT, como se indica en contexto, con un residuo de aminoácidos en una segunda secuencia, mientras que el residuo de aminoácidos en la segunda secuencia puede ser diferente en identidad de la primera. Adecuadamente, los residuos correspondientes compartirán el mismo número (y letra) si el marco y las CDR tienen la misma longitud de acuerdo con la definición de EU o IMGT. La alineación se puede lograr manualmente o mediante el uso, por ejemplo, de un algoritmo informático conocido para la alineación de secuencias tales como NCBI BLAST v2.0 (BLASTP o BLASTN) mediante el uso de ajustes estándar.

En la presente, las referencias a un "**epítopo**" se refieren a la porción de la diana a la que se fija específicamente el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este. Los epítopos también se pueden denominar "**determinantes antigénicos**". Un anticuerpo se fija "**esencialmente al mismo epítopo**" que otro anticuerpo cuando ambos reconocen epítopos idénticos o que se superponen estéricamente. Los métodos usados comúnmente para determinar si dos anticuerpos se fijan a epítopos idénticos o que se superponen son ensayos de competencia, que se pueden configurar en una cantidad de formatos diferentes (por ejemplo, placas de cavidades con el uso de etiquetas radioactivas o de enzimas, o citometría de flujo en células que expresan antígenos) mediante el uso de antígeno etiquetado o anticuerpo etiquetado. Un anticuerpo se fija "**al mismo epítopo**" que otro anticuerpo cuando ambos reconocen epítopos idénticos (es decir, todos los puntos de contacto entre el antígeno y el anticuerpo son los mismos).

Los epítopos encontrados en dianas de proteínas pueden definirse como "**epítopos lineales**" o "**epítopos conformacionales**". Los epítopos lineales se forman mediante una secuencia continua de aminoácidos en un antígeno de proteína. Los epítopos conformacionales se forman de aminoácidos que son discontinuos en la secuencia de proteína, pero que se unen al plegar la proteína en su estructura tridimensional.

El término "**vector**", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido

nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al cual se ligó. Un tipo de vector es un "**plásmido**", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al cual se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de realizar una replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos y levadura). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) se pueden integrar al genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, por lo tanto, se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están operativamente ligados. Estos vectores se denominan en la presente "**vectores de expresión recombinante**" (o simplemente "**vectores de expresión**"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que ofrecen funciones equivalentes, y también bacteriófagos y sistemas de fagémidos. La expresión "**célula huésped recombinante**" (o simplemente "**célula huésped**"), como se usa en la presente, se refiere a una célula en la que se introdujo un vector de expresión recombinante. Dichas expresiones pretenden referirse no solo a la célula del sujeto particular sino a la progenie de dicha célula, por ejemplo, cuando dicha progenie se emplea para elaborar una línea celular o banco de células que luego opcionalmente se almacena, proporciona, vende, transfiere o emplea para fabricar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente.

Las referencias a "**sujeto**", "**paciente**" o "**individuo**" se refieren a un sujeto, en particular, un sujeto mamífero, que se debe tratar. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, primates no humanos, animales de granja (tales como vacas), animales de deporte o mascotas, tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas o ratones. En alguna forma de realización, el sujeto es un ser humano. En formas de realización alternativas, el sujeto es un mamífero no humano, tal como un ratón.

La expresión "**cantidad suficiente**" significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado. La expresión "**cantidad terapéuticamente eficaz**" es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad o un trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una "**cantidad profilácticamente eficaz**" ya que profilaxis puede considerarse tratamiento.

Una enfermedad o un trastorno se "**mejora**" si disminuye la gravedad de un signo o síntoma de la enfermedad o el trastorno, la frecuencia con la que dicho signo o síntoma es experimentado por un sujeto, o ambos (en comparación con un punto temporal anterior, por ejemplo, antes de la administración de cualquier anticuerpo).

Como se usa en la presente, "**tratar una enfermedad o un trastorno**" significa reducir la frecuencia y/o gravedad de al menos un signo o síntoma de la enfermedad o el trastorno experimentado por un sujeto (en comparación con un punto temporal anterior, por ejemplo, antes de la administración de algún anticuerpo).

"**Cáncer**", como se usa en la presente, se refiere al crecimiento o división anormal de células. En general, el crecimiento y/o la expectativa de vida de una célula cancerosa excede, y no está coordinada con, los de las células normales y el tejido alrededor de estas. Los tipos de cáncer pueden ser benignos, premalignos o malignos. El cáncer se genera en diversas células y tejidos, incluso la cavidad oral (por ejemplo, boca, lengua, faringe, etc.), sistema digestivo (por ejemplo, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, hígado, vías biliares, vesícula biliar, páncreas, etc.), sistema respiratorio (por ejemplo, laringe, pulmón, bronquios, etc.), huesos, articulaciones, piel (por ejemplo, células basales, células escamosas, meningioma, etc.), mama, sistema genital (por ejemplo, útero, ovario, próstata, testículos, etc.), sistema urinario (por ejemplo, vejiga, riñón, uretra, etc.), ojo, sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, etc.), sistema endocrino (por ejemplo, tiroides, etc.), y sistema hematopoyético (por ejemplo, linfoma, mieloma, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, etc.).

Como se usa en la presente, la expresión "**alrededor de**" cuando se usa en la presente incluye hasta 10 % más inclusive y hasta 10 % menos inclusive del valor especificado, adecuadamente hasta 5 % más inclusive y hasta 5 % menos inclusive del valor especificado, especialmente el valor especificado. El término "entre" incluye los valores de los límites especificados.

Anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de fijación al antígeno de estos

Se proporcionan en la presente anticuerpos multiespecíficos que pueden fijarse específicamente a la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T γδ (TCR), y que también pueden fijarse específicamente a EGFR. La invención se refiere al uso de dichos anticuerpos como medicamentos para la administración a un sujeto que se debe tratar.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es un scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, dominio variable (por ejemplo, VH o VL), diacuerpo, minicuerpo o anticuerpo monoclonal. En una forma de realización adicional, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es un scFv.

Los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden ser de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD o isotipos de estos, y pueden comprender una cadena liviana kappa o lambda. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, por ejemplo, al menos uno de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una forma de realización adicional, el anticuerpo puede estar en un formato, tal como un formato IgG, que fue modificado para otorgar propiedades deseadas, tales como tener el Fc mutado para reducir la función efectora, extender la semivida, alterar ADCC, o mejorar la estabilidad de la bisagra. Tales modificaciones son bien conocidas en la técnica.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es humano. Por lo tanto, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este puede derivarse de una secuencia de inmunoglobulina (Ig) humana. La CDR, región de marco y/o región constante del anticuerpo (o fragmento de fijación al antígeno de este) puede derivarse de una secuencia de Ig humana, en particular una secuencia de IgG humana. La CDR, región de marco y/o región constante del anticuerpo puede ser sustancialmente idéntica para una secuencia de Ig humana, en particular una secuencia de IgG humana. Una ventaja del uso de anticuerpos humanos es que no son inmunogénicos o tienen baja inmunogenicidad en seres humanos.

Un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este también puede ser quimérico, por ejemplo, un anticuerpo quimérico ratón-humano.

Alternativamente, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este se deriva de una especie no humana, tal como un ratón. Tales anticuerpos no humanos pueden modificarse para aumentar su similitud a variantes de anticuerpos producidas naturalmente en seres humanos, por lo que el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este puede estar parcial o completamente humanizado. Por lo tanto, en una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este está humanizado.

Resumen de regiones Fab específicas proporcionadas en la presente

A continuación, se proporciona un resumen de algunas de las moléculas de fijación al antígeno (es decir, anticuerpos) específicas usadas en la presente invención, con identificación de la SEQ ID NO asignada en el listado de secuencias adjunto. Las variantes de fijación al antígeno, los derivados y los fragmentos de estas también se proporcionan como parte de la presente invención. Las secuencias se proporcionan en el listado de secuencias adjunto y las Figuras adjuntas. De haber alguna discrepancia entre las secuencias en el listado y las de las Figuras 22 a 25, prevalecerán las secuencias de las Figuras.

Tabla 1. Resumen de regiones Fab derivadas de ADT1-4 (cadena pesada) y las SEQ ID NO relacionadas

Anticuerpo	VH	HFR1	VHCDR1	HFR2	VHCDR2	HFR3	VHCDR3	HFR4

ADT1-4 parental	1	170	51	172	53	173	54	174
ADT1-4-105	2	170	51	172	53	173	55	174
ADT1-4-107	3	170	51	172	53	173	56	174
ADT1-4-110	4	170	51	172	53	173	57	174
ADT1-4-112	5	170	51	172	53	173	58	174
ADT1-4-117	6	170	51	172	53	173	59	174
ADT1-4-19	7	170	51	172	53	173	60	174
ADT1-4-21	8	170	**52**	172	53	173	61	174
ADT1-4-31	9	170	51	172	53	173	62	174
ADT1-4-139	10	170	51	172	53	173	63	174
ADT1-4-4	11	170	51	172	53	173	64	174
ADT1-4-143	12	**171**	51	172	53	173	65	174
ADT1-4-53	13	170	**52**	172	53	173	66	174
ADT1-4-173	14	170	51	172	53	173	67	174
ADT1-4-2	15	170	51	172	53	173	68	174
ADT1-4-8	16	170	51	172	53	173	69	174
ADT1-4-82	17	170	51	172	53	173	70	174
ADT1-4-83	18	170	51	172	53	173	71	174
ADT1-4-3	19	170	51	172	53	173	72	174
ADT1-4-84	20	170	51	172	53	173	73	174
ADT1-4-86	21	170	**52**	172	53	173	74	174
ADT1-4-95	22	170	51	172	53	173	75	174
ADT1-4-1	23	170	51	172	53	173	76	174
ADT1-4-6	24	170	51	172	53	173	77	174
ADT1-4-138	25	170	51	172	53	173	78	174

Tabla 2. Resumen de regiones Fab derivadas de ADT1-4 (cadena liviana) y las SEQ ID NO relacionadas

Anticuerpo	**VL**	**LFR1**	**VLCDR1**	**LFR2**	**VLCDR2**	**LFR3**	**VLCDR3**	**LFR4**
ADT1-4 parental	26	175	79	176	80	178	81	179
ADT1-4-105	27	175	79	176	80	177	82	179
ADT1-4-107	28	175	79	176	80	177	83	179
ADT1-4-110	29	175	79	176	80	177	84	180
ADT1-4-112	30	175	79	176	80	177	85	179

ADT1-4-117	31	175	79	176	80	177	86	179
ADT1-4-19	32	175	79	176	80	177	87	179
ADT1-4-21	33	175	79	176	80	177	88	179
ADT1-4-31	34	175	79	176	80	177	89	179
ADT1-4-139	35	175	79	176	80	177	90	179
ADT1-4-4	36	175	79	176	80	177	91	179
ADT1-4-143	37	175	79	176	80	177	92	181
ADT1-4-53	38	175	79	176	80	177	93	179
ADT1-4-173	39	175	79	176	80	177	94	179
ADT1-4-2	40	175	79	176	80	177	95	179
ADT1-4-8	41	175	79	176	80	177	96	179
ADT1-4-82	42	175	79	176	80	177	97	179
ADT1-4-83	43	175	79	176	80	177	98	179
ADT1-4-3	44	175	79	176	80	177	99	179
ADT1-4-84	45	175	79	176	80	177	100	179
ADT1-4-86	46	175	79	176	80	177	101	179
ADT1-4-95	47	175	79	176	80	177	102	182
ADT1-4-1	48	175	79	176	80	177	103	179
ADT1-4-6	49	175	79	176	80	177	104	179
ADT1-4-138	50	175	79	176	80	**178**	105	179

Tabla 3. Resumen de regiones Fab derivadas de ADT1-7 (cadena pesada) y las SEQ ID NO relacionadas

Anticuerpo	**VH**	**HFR1**	**VHCDR1**	**HFR2**	**VHCDR2**	**HFR3**	**VHCDR3**	**HFR4**
ADT1-4 parental	106	189	130	190	131	191	132	192
ADT1-7-10	107	189	130	190	131	191	133	192
ADT1-7-15	108	189	130	190	131	191	134	192
ADT1-7-17	109	189	130	190	131	191	135	192
ADT1-7-18	110	189	130	190	131	191	136	192
ADT1-7-19	111	189	130	190	131	191	137	192
ADT1-7-20	112	189	130	190	131	191	138	192
ADT1-7-22	113	189	130	190	131	191	139	192
ADT1-7-23	114	189	130	190	131	191	140	192

ADT1-7-42	115	189	130	190	131	191	141	192
ADT1-7-3	116	189	130	190	131	191	142	192
ADT1-7-61	117	189	130	190	131	191	143	192

Tabla 4. Resumen de regiones Fab derivadas de ADT1-7 (cadena liviana) y las SEQ ID NO relacionadas

Anticuerpo	**VL**	**LFR1**	**VLCDR1**	**LFR2**	**VLCDR2**	**LFR3**	**VLCDR3**	**LFR4**
ADT1-7 parental	118	193	144	195	145	196	146	197
ADT1-7-10	119	193	144	195	145	196	147	197
ADT1-7-15	120	193	144	195	145	196	148	197
ADT1-7-17	121	193	144	195	145	196	149	197
ADT1-7-18	122	**194**	144	195	145	196	150	197
ADT1-7-19	123	193	144	195	145	196	151	197
ADT1-7-20	124	193	144	195	145	196	152	197
ADT1-7-22	125	193	144	195	145	196	153	197
ADT1-7-23	126	193	144	195	145	196	154	197
ADT1-7-42	127	193	144	195	145	196	155	197
ADT1-7-3	128	193	144	195	145	196	156	197
ADT1-7-61	129	193	144	195	145	196	157	197

Tabla 5. Resumen de otras regiones Fab parentales y las SEQ ID NO relacionadas

Anticuerpo parental	**VH**	**VL**
C08	273	282
B07	274	283
C05	275	284
E04	276	285
F07	277	286
G06	278	287
G09	279	288
B09	280	289
G10	281	290
E01	312	313

Regiones Fab derivadas de ADT1-4 y ADT1-7

La presente invención proporciona anticuerpos multiespecíficos en donde las regiones Fab derivan del anticuerpo ADT1-4 parental (que tiene una secuencia de región pesada variable de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de región liviana variable light de acuerdo con SEQ ID NO: 26), y anticuerpos derivados del anticuerpo ADT1-7 parental (que tiene una secuencia de región pesada variable de acuerdo con SEQ ID NO: 106 y una secuencia de región liviana variable de acuerdo con SEQ ID No: 118). ADT1-4 también se denomina en la presente G04, y ADT1-4 y G04 se usan indistintamente. ADT1-7 también se denomina en la presente E07, y ADT1-7 y E07 se usa indistintamente.

En algunas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 55 a 78 y 133 a 143; y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 82 a 105 y 147 a 157. Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

En algunas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende:

una VHCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51, 52 y 130.

una VHCDR2 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos

95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 53 y 131; y

una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 55 a 78 y 133 a 143; y

una región variable de cadena liviana que comprende:

una VLCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 79 y 144;

una VLCDR2 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 80 y 145; y

una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 82 a 105 y 147 a 157.

Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar una o más regiones Fab variantes como se describen en la presente.

En algunas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 25 y 107 a 117; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que

tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 50 y 119 a 129.

Regiones Fab derivadas de ADT1-4

La presente invención proporciona anticuerpos multiespecíficos que comprenden regiones Fab derivadas del anticuerpo ADT1-4 parental (que tiene una secuencia de región pesada variable de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de región liviana variable light de acuerdo con SEQ ID NO: 26), por ejemplo, como se establece a continuación. ADT1-4 también se denomina en la presente G04, y ADT1-4 y G04 se usan indistintamente.

Anticuerpos que comprenden secuencias de CDR particulares derivadas de ADT1-4

Los anticuerpos multiespecíficos proporcionados en la presente incluyen las siguientes regiones Fab que tienen secuencias particulares derivadas de ADT1-4.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 55 a 78; y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 82 a 105. Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 55 a 77; y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 82 a 104. Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

En algunas formas de realización, hay anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58, 60, 61, 62, 65, 66, 68, 74, 76 y 77; y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:

85, 87, 88, 89, 92, 93, 95, 101, 103 y 104. Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende:

una VHCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51 y 52;

una VHCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y

una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 55 a 78; y

una región variable de cadena liviana que comprende:

una VLCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79;

una VLCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80; y

una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 82 a 105.

Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende:

una VHCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51 y 52;

una VHCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y

una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 55 a 77; y

una región variable de cadena liviana que comprende:

una VLCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79;

una VLCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80; y

una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 82 a 104.

Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende:

una VHCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51 y 52;

una VHCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y

una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 58, 60, 61, 62, 65, 66, 68, 74, 76 y 77; y

una región variable de cadena liviana que comprende:

una VLCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79;

una VLCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80; y

una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 85, 87, 88, 89, 92, 93, 95, 101, 103 y 104.

Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende

a) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 55, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 82, respectivamente;

b) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 56, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 83, respectivamente;

c) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 57, respectivamente, y una VLCDR1, una

VLCDR2 y una VLCDR3 que comprende o consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 84, respectivamente;

d) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 58, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 85, respectivamente;

e) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 59, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 86, respectivamente;

f) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 60, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprende o consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 87, respectivamente;

g) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 61, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 88, respectivamente;

h) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 62, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 89, respectivamente;

i) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 63, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 90, respectivamente;

j) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 64, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 91, respectivamente;

k) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 65, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 92, respectivamente;

l) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las

secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 66, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 93, respectivamente;

m) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 67, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 94, respectivamente;

n) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente;

o) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 69, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 96, respectivamente;

p) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 70, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 97, respectivamente;

q) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 71, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 98, respectivamente;

r) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 72, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 99, respectivamente;

s) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 73, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 100, respectivamente;

t) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 74, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 101, respectivamente;

u) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 75, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 102, respectivamente;

v) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 76, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 103, respectivamente;

w) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 77, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 104, respectivamente; o;

x) una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 78, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 105, respectivamente.

Los anticuerpos multiespecíficos pueden comprender una secuencia variable de la cadena liviana kappa (o comprender una cadena liviana variable que deriva de una secuencia variable de la cadena liviana kappa), en donde el residuo en la posición 74 de la secuencia variable de la cadena liviana kappa de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT no es serina, por ejemplo, un residuo que no es de la línea germinal humana y/o un residuo no polar en la posición 74, por ejemplo, el residuo en la posición 74 es un residuo de leucina.

A continuación, se proporcionan formas de realización adicionales.

ADT1-4-105 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-105 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al

menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes con regiones Fab derivadas de ADT1-4-105, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes con regiones Fab derivadas de ADT1-4-105, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos

multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-107 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-107 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y/o una región variable de cadena liviana que

comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que comprenden regiones Fab derivadas de ADT1-4-107, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos

95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que comprenden regiones Fab derivadas de ADT1-4-107, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-110 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-110 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 84.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que comprenden regiones Fab derivadas de ADT1-4-110, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la

región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que comprenden regiones Fab derivadas de ADT1-4-110, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-112 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-112 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-112, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, que comprende opcionalmente 1 o 2

sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes con regiones Fab derivadas de ADT1-4-112, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-117 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-117 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes con regiones Fab derivadas de ADT1-4-117, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la

región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes con regiones Fab derivadas de ADT1-4-117, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-19 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-19 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos

80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que comprenden regiones Fab derivadas de ADT1-4-19, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos

95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes con regiones Fab derivadas de ADT1-4-19, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-21 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-21 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes con regiones Fab derivadas de ADT1-4-21, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al

menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que comprenden regiones Fab derivadas de ADT1-4-21, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR

comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-31 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-31 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %

de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-31, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-31, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 que comprende opcionalmente 1 o 2

sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-139 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-139 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-139, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-139, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, que comprende opcionalmente 1 o 2

sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-4 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-4 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-4, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una

VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al

menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-4, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-143 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-143 y fragmentos y

variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-143, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al

menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-143, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-53 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-53 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos

94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-53, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-53, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-173 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-173 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 94. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-173, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al

menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-173, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-2 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-2 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95. En una forma de realización, se

proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-2, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos

75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-2, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-8 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-8 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes

que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-8, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al

menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-8, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de

aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-82 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-82 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-82, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, que comprende

opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que

comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-82, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-83 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-83 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-83, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al

menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-83, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-3 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-3 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de

identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-3, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al

menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 99.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-3, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-84 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-84 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al

antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-84, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-84, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-86 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-86 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable

delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-86, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos

93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-86, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-95 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-95 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-95, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos

multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que

comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-95, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-1 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-1 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-1, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser

sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una

VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-1, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-6 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-6 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos

multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-6, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-6, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-4-138 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-4-138 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y/o una región variable de cadena

liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-138, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al

menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-4-138, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

Anticuerpos que comprenden regiones variables de cadena pesada y/o liviana derivados de ADT1-4

Se proporcionan en la presente anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 25; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 50.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 24; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 49.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 23 y 24; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, 32, 33, 34, 37, 38, 40, 46, 48 y 49.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 25; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 50.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 24; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 49.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 23 y 24; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, 32, 33, 34, 37, 38, 40, 46, 48 y 49.

Opcionalmente, los anticuerpos anteriores retienen las secuencias de CDR correspondientes de modo que cualquier variabilidad en las secuencias de VH y VL tiene lugar en las regiones de marco.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 25; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 50.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 24; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 49.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 23 y 24; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, 32, 33, 34, 37, 38, 40, 46, 48 y 49.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al

menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27;

b) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;

c) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29;

d) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;

e) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;

f) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;

g) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;

h) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;

i) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;

j) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

k) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

l) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;

m) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39;

n) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40;

o) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41;

p) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;

q) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;

r) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 44;

s) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45;

t) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;

u) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47;

v) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48;

w) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; o

x) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

Opcionalmente, los anticuerpos anteriores retienen las secuencias de CDR correspondientes de modo que cualquier variabilidad en las secuencias de VH y VL tiene lugar en las regiones de marco.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27;

b) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al

menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;

c) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29;

d) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;

e) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;

f) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;

g) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;

h) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;

i) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;

j) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

k) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

l) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;

m) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39;

n) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40;

o) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41;

p) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;

q) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;

r) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;

s) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 45;

t) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;

u) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47;

v) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48;

w) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; o

x) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

Opcionalmente, los anticuerpos anteriores retienen las secuencias de CDR correspondientes de modo que cualquier variabilidad en las secuencias de VH y VL tiene lugar en las regiones de marco.

Opcionalmente, los anticuerpos anteriores retienen las secuencias de CDR correspondientes de modo que cualquier variabilidad en las secuencias de VH y VL tiene lugar en las regiones de marco.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

b) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 que

comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

c) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

d) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

e) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

f) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

g) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

h) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

i) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

j) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

k) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

12 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

l) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

m) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

n) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

o) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

p) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

q) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

r) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

s) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

t) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

u) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

v) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

w) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables; o

x) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables.

"En ambas regiones variables" significa que, colectivamente, el anticuerpo puede comprender hasta la cantidad especificada de sustituciones en total cuando se consideran tanto la región variable de la cadena pesada como la región variable de la cadena liviana. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas formas de realización, las sustituciones (si están presentes) pueden producirse en cualquier lugar en las secuencias de región variable. En formas de realización preferidas, las sustituciones (si están presentes) pueden estar limitadas a las regiones de marco. En consecuencia, en algunas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos no se producen en una secuencia de CDR.

Opcionalmente, los anticuerpos anteriores retienen las secuencias de CDR correspondientes de modo que cualquier variabilidad en las secuencias de VH y VL tiene lugar en las regiones de marco.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

2 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27;

b) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;

c) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29;

d) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;

e) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;

f) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;

g) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;

h) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;

i) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;

j) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

k) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

l) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;

m) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39;

n) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40;

o) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41;

p) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;

q) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;

r) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;

s) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45;

t) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;

u) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47;

v) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48;

w) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; o

x) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

En cualquier forma de realización relacionada con las regiones Fab que tienen secuencias de VH y/o de VL definidas (por ejemplo, cualquier secuencia de VH y/o de VL definida como que tiene cierto porcentaje de identidad y/o sustitución), preferentemente la secuencia de VH no es SEQ ID NO: 1 y la secuencia de VL no es SEQ ID NO: 26.

Otros anticuerpos que comprenden regiones Fab derivados de ADT1-4

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de GDSVSSKSX_1A (SEQ ID NO: 158);

b) una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 53

c) una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia X_2W$X_3$$X_4$$X_5$$X_6DX_7$ (SEQ ID NO: 162), en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 54;

d) una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 79;

e) una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 80; y

f) una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de QQX_8Y$X_9$$X_{10}$$X_{11}$$X_{12}$$X_{13}$T (SEQ ID NO: 166), en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 81;

y en donde cada uno de X_1 a X_{13} es un aminoácido natural.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de GDSVSSKSX$_1$A (SEQ ID NO: 159);

b) una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 53

c) una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de X$_2$WX$_3$X$_4$X$_5$X$_6$DX$_7$ (SEQ ID NO: 163), en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 54;

d) una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 79;

e) una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 80; y

f) una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de QQX$_8$YX$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$T (SEQ ID NO: 167), en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 81;

y en donde: X$_1$ se selecciona del grupo que consiste en A y V; X$_2$ se selecciona del grupo que consiste en S y T; X$_3$ se selecciona del grupo que consiste en V, A y L; X$_4$ se selecciona del grupo que consiste en G, E, y D; X$_5$ se selecciona del grupo que consiste en Y y N; X$_6$ se selecciona del grupo que consiste en V, A y P; X$_7$ se selecciona del grupo que consiste en V, Y y R; X$_8$ se selecciona del grupo que consiste en K, R y G; X$_9$ se selecciona del grupo que consiste en S y K; X$_{10}$ se selecciona del grupo que consiste en T, Q, A, E y D; X$_{11}$ se selecciona del grupo que consiste en P, H y D; X$_{12}$ se selecciona del grupo que consiste en Q, R, K, W, P, E e I; y X$_{13}$ se selecciona del grupo que consiste en I, V y L. El anticuerpo puede comprender además una secuencia de HFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 170 o 171; una secuencia de HFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 172; una secuencia de HFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 173; una secuencia de HFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 174; una secuencia de LFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 175; una secuencia de LFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 176; una secuencia de LFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 177 o 178; y una secuencia de LFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 179, 180, 181 o 182.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de GDSVSSKSX$_1$A (SEQ ID NO: 160);

b) una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID

NO: 53

c) una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $X_2WX_3X_4X_5X_6DX_7$ (SEQ ID NO: 164), en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 54;

d) una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 79;

e) una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 80; y

f) una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $QQX_8YX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}T$ (SEQ ID NO: 168), en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 81;

y en donde X_1 se selecciona del grupo que consiste en A y V; X_2 se selecciona del grupo que consiste en S y T; X_3 se selecciona del grupo que consiste en V, A y L; X_4 se selecciona del grupo que consiste en G, E, y D; X_5 se selecciona del grupo que consiste en Y y N; X_6 se selecciona del grupo que consiste en V, A y P; X_7 se selecciona del grupo que consiste en V, Y y R; X_8 se selecciona del grupo que consiste en K, R y G; X_9 se selecciona del grupo que consiste en S y K; X_{10} se selecciona del grupo que consiste en T, Q, A, E y D; X_{11} se selecciona del grupo que consiste en P y H; X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Q, R, K, W, P, E e I; y X_{13} se selecciona del grupo que consiste en I, V y L. El anticuerpo puede comprender además una secuencia de HFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 170 o 171, una secuencia de HFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 172, una secuencia de HFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 173, una secuencia de HFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 174, una secuencia de LFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 175, una secuencia de LFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 176, una secuencia de LFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 177 y una secuencia de LFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 179, 180, 181 o 182.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de $GDSVSSKSX_1A$ (SEQ ID NO: 161);

b) una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 53

c) una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $X_2WX_3X_4X_5X_6DX_7$ (SEQ ID NO: 165), en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 54;

d) una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 79;

e) una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 80; y

f) una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $QQX_8YX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}T$ (SEQ ID NO: 169), en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 81;

y en donde X_1 se selecciona del grupo que consiste en A y V; X_2 se selecciona del grupo que consiste en S y T; X_3 se selecciona del grupo que consiste en V, A y L; X_4 se selecciona del grupo que consiste en G y D; X_5 se selecciona del grupo que consiste en Y y N; X_6 se selecciona del grupo que consiste en V, A y P; X_7 se selecciona del grupo que consiste en V, Y y R; X_8 se selecciona del grupo que consiste en K y R; X_9 se selecciona del grupo que consiste en S y K; X_{10} se selecciona del grupo que consiste en T, Q, A y E; X_{11} se selecciona del grupo que consiste en P y H; X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Q, K, W, P e I; y X_{13} se selecciona del grupo que consiste en V y L. El anticuerpo puede comprender además una secuencia de HFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 170 o 171; una secuencia de HFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 172; una secuencia de HFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 173; una secuencia de HFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 174; una secuencia de LFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 175; una secuencia de LFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 176; una secuencia de LFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 177; y una secuencia de LFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 179 o 181.

Regiones Fab derivadas de ADT1-7

La presente invención proporciona anticuerpos multiespecíficos que comprenden regiones Fab derivadas del anticuerpo parental ADT1-7 (que tiene una secuencia de región pesada variable de acuerdo con SEQ ID NO: 106 y una secuencia de región liviana variable de acuerdo con SEQ ID NO: 118), por ejemplo, como se establece a continuación. ADT1-7 también se denomina en la presente E07, y ADT1-7 y E07 se usan indistintamente.

Anticuerpos que comprenden secuencias de CDR particulares derivadas de ADT1-7

Los anticuerpos multiespecíficos proporcionados en la presente incluyen las siguientes regiones Fab que tienen secuencias particulares derivadas de ADT1-7.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 133 a 143; y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste

en SEQ ID NO: 147 a 157. Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 138, 142 y 143 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 152, 156 y 157. Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende:

una VHCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130;

una VHCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131; y

una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 133 a 143; y

una región variable de cadena liviana que comprende:

una VLCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144;

una VLCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145; y

una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 147 a 157.

Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende:

una VHCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130;

una VHCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131; y

una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 138, 142 y 143; y

una región variable de cadena liviana que comprende:

una VLCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144;

una VLCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145; y

una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 152, 156 y 157.

Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

A continuación, se proporcionan formas de realización adicionales.

ADT1-7-10 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-10 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-10, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-10, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145

que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-15 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-15 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-15, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 134; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-15, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-17 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-17 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-17, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde

la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-17, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-18 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-18 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-18, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos

85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-18, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-19 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-19 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos

91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-19, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-19, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos

multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-20 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-20 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 y/o una región variable de la

cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-20, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos

95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-20, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VHCDR3 que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-22 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-22 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-22, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la

región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-22, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-23 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-23 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-23, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140, que comprende opcionalmente 1 o 2

sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-23, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-42 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-42 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 155. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 155. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 155.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-42, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 155, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 155.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 155.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la

región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 155.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-42, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 155 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-3 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-3 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos

80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-3, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos

95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-3, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

ADT1-7-61 y fragmentos y variantes de este

Ciertas formas de realización se refieren al anticuerpo ADT1-7-61 y fragmentos y variantes de este.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos

97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno o variante de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157. En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-61, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157, que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al

menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143; y

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para proporcionar anticuerpos variantes que tienen regiones Fab derivadas de ADT1-7-61, por ejemplo, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR

comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VHCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, y una VHCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende una VLCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos, una VLCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y una VLCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157 que comprende opcionalmente 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Alternativamente, los anticuerpos pueden consistir en las secuencias especificadas (con o sin sustituciones de aminoácidos).

Anticuerpos que comprenden regiones variables de las cadenas pesada y/o liviana derivadas de ADT1-7

Se proporcionan en la presente anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107 a 117; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 119 a 129.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos

97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 112, 116 y 117; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 124, 128 y 129.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107 a 117; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 119 a 129.

También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos, en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 112, 116 y 117; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 124, 128 y 129.

Opcionalmente, los anticuerpos anteriores retienen las secuencias de CDR correspondientes de modo que cualquier variabilidad en las secuencias de VH y VL tiene lugar en las regiones de marco.

Se proporcionan en la presente anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107 a 117; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 119 a 129.

También se proporcionan en la presente anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 112, 116 y 117; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 124, 128 y 129.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119;

b) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120;

c) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121;

d) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122;

e) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123;

f) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124;

g) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125;

h) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 y una VL que comprende

o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 126;

i) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 127;

j) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128; o

k) una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129.

Opcionalmente, los anticuerpos anteriores retienen las secuencias de CDR correspondientes de modo que cualquier variabilidad en las secuencias de VH y VL tiene lugar en las regiones de marco.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

b) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

c) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

d) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

e) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

f) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

g) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

h) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 126 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

i) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables;

j) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables; o

k) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129 que comprende opcionalmente hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución de aminoácidos en ambas regiones variables.

"En ambas regiones variables" significa que, colectivamente, el anticuerpo puede comprender hasta la cantidad especificada de sustituciones en total cuando se consideran tanto la región variable de la cadena pesada como la región variable de la cadena liviana. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas formas de realización, las sustituciones (si están presentes) pueden producirse en cualquier lugar en las secuencias de región variable. En formas de realización preferidas, las sustituciones (si están presentes) pueden estar limitadas a las regiones de marco. En

consecuencia, en algunas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos no se producen en una secuencia de CDR.

Opcionalmente, los anticuerpos anteriores retienen las secuencias de CDR correspondientes de modo que cualquier variabilidad en las secuencias de VH y VL tiene lugar en las regiones de marco.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119;

b) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120;

c) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121;

d) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122;

e) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123;

f) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124;

g) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125;

h) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 126;

i) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 127;

j) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128; o

k) una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129.

Se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos para proporcionar uno o más anticuerpos variantes como se describen en la presente.

En cualquier forma de realización relacionada con las regiones Fab que tienen secuencias de VH y/o de VL definidas (por ejemplo, cualquier secuencia de VH y/o de VL definida como que tiene cierto porcentaje de identidad y/o sustitución), preferentemente la secuencia de VH no es SEQ ID NO: 106 y la secuencia de VL no es SEQ ID NO: 118.

Otros anticuerpos que comprenden regiones Fab derivadas de ADT1-7

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 130;

b) una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 131;

c) una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $X_1X_2YX_3X_4$AFDI (SEQ ID NO: 183), en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 132;

d) una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 144;

e) una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 145; y

f) una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$ (SEQ ID NO: 186), en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 146;

en donde cada uno de X_1 a X_9 es un aminoácido natural.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 130;

b) una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 131;

c) una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $X_1X_2YX_3X_4$AFDI (SEQ ID NO: 184), en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 132;

d) una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 144;

e) una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 145; y

f) una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$ (SEQ ID NO: 187), en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 146;

en donde X_1 se selecciona del grupo que consiste en D, I y V; X_2 se selecciona del grupo que consiste en D y S; X_3 se selecciona del grupo que consiste en N, E, D, Q y A; X_4 se selecciona del grupo que consiste en D y E; X_5 se selecciona del grupo que consiste en T y S; X_6 se selecciona del grupo que consiste en A, G, Y y S; X_7 se selecciona del grupo que consiste en S y D; X_8 se selecciona del grupo que consiste en T, E y G; y X_9 se selecciona del grupo que consiste

en L y D. El anticuerpo puede comprender además una secuencia de HFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 189; una secuencia de HFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 190; una secuencia de HFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 191; una secuencia de HFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 192; una secuencia de LFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 193 y 194; una secuencia de LFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 195; una secuencia de LFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 196; y una secuencia de LFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 197.

En una forma de realización, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos en donde la región Fab de fijación a anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR comprende:

a) una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 130

b) una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 131

c) una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $X_1X_2YX_3X_4AFDI$ (SEQ ID NO: 185), en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 132;

d) una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 144;

e) una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 145; y

f) una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$ (SEQ ID NO: 188), en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 146;

en donde X_1 se selecciona del grupo que consiste en D y V; X_2 se selecciona del grupo que consiste en D y S; X_3 se selecciona del grupo que consiste en D, Q y A; X_4 se selecciona del grupo que consiste en D y E; X_5 es S; X_6 se selecciona del grupo que consiste en A y Y; X_7 es S; X_8 se selecciona del grupo que consiste en E y G; y X_9 se selecciona del grupo que consiste en L y D. El anticuerpo puede comprender además una secuencia de HFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 189; una secuencia de HFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 190; una secuencia de HFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 191; una secuencia de HFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 192; una secuencia de LFR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 193; una secuencia de LFR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 195; una secuencia de LFR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 196; y una secuencia de LFR4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 197.

Anticuerpos que tienen sustituciones de secuencia

La persona del oficio de nivel medio está al tanto de que diversos aminoácidos tienen propiedades similares. Uno o más de tales aminoácidos de una sustancia pueden sustituirse a

menudo por uno o más de otros de tales aminoácidos sin eliminar una actividad deseada de esa sustancia.

Por lo tanto, los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina pueden sustituirse a menudo entre sí (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). De estas sustituciones posibles, se prefiere que la glicina y la alanina se sustituyan entre sí (ya que tienen cadenas laterales relativamente cortas) y que la valina, la leucina y la isoleucina se sustituyan entre sí (ya que tienen cadenas laterales alifáticas más grandes que son hidrófobas). Otros aminoácidos que pueden sustituirse a menudo entre sí incluyen: fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas); lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas); aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas); asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Una sustitución de aminoácidos "conservadora" es una sustitución de aminoácidos en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido de estructura química similar y que se espera que tenga poca influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Adecuadamente, tales sustituciones conservadoras son sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos se sustituye por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo:

Grupo	**Residuo de aminoácido**
Alifático no polar	Glicina
	Alanina
	Valina
	Metionina
	Leucina
	Isoleucina
Aromático	Fenilalanina
	Tirosina
	Triptófano
Sin carga polar	Serina
	Treonina
	Cisteína
	Prolina
	Asparagina

	Glutamina
Cargado negativamente	Aspartato
	Glutamato
Cargado positivamente	Lisina
	Arginina
	Histidina

Adecuadamente, un residuo de aminoácido hidrófobo es un aminoácido no polar. Más adecuadamente, un residuo de aminoácido hidrófobo se selecciona de V, I, L, M, F, W o C. En algunas formas de realización, se selecciona un residuo de aminoácido hidrófobo de glicina, alanina, valina, metionina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina o triptófano.

Por lo tanto, las referencias a sustituciones de aminoácidos "conservadoras" se refieren a sustituciones de aminoácidos en las que uno o más de los aminoácidos en la secuencia del anticuerpo (por ejemplo, en las CDR o en las secuencias de VH o VL) se sustituyen por otro aminoácido en la misma clase de la manera indicada anteriormente. Se pueden preferir las sustituciones de aminoácidos conservadoras en las regiones de CDR para minimizar los efectos adversos sobre la función del anticuerpo. Sin embargo, las sustituciones de aminoácidos conservadoras también pueden producirse en las regiones de marco. Por lo tanto, en algunas formas de realización, cualquier sustitución en las CDR puede ser sustituciones conservadoras, mientras que las sustituciones en las regiones de marco pueden ser sustituciones de aminoácidos naturales por otros aminoácidos naturales.

También se pueden realizar eliminaciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos proporcionadas para los anticuerpos descritos en la presente. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden eliminar los aminoácidos que no tienen un efecto sustancial sobre la actividad del polipéptido, o al menos que no eliminan tal actividad. Tales eliminaciones pueden ser ventajosas, ya que la longitud total y el peso molecular de un polipéptido pueden reducirse sin perder actividad. Esto puede permitir la reducción de la cantidad de polipéptido necesaria para un propósito particular; por ejemplo, se pueden reducir los niveles de dosis.

Los cambios de aminoácidos con respecto a las secuencias proporcionadas en la presente pueden realizarse con cualquier técnica adecuada, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o síntesis en estado sólido.

Debe apreciarse que las sustituciones o inserciones de aminoácidos dentro del alcance de la presente invención pueden realizarse con el uso de aminoácidos naturales o no naturales, aunque puede que se prefieran los aminoácidos naturales. Sea que se usen aminoácidos naturales o sintéticos, puede que se prefiera la presencia exclusiva de aminoácidos L.

Se proporcionan en la presente diversas formas de realización que comprenden sustituciones de aminoácidos opcionales en las secuencias proporcionadas. Además, en una forma de realización de la invención, se proporcionan anticuerpos, o un fragmento de fijación al antígeno de estos, de la invención que comprenden hasta 10, adecuadamente hasta 5 o adecuadamente hasta 2 sustituciones de aminoácidos en el dominio de fijación de anticuerpo o los dominios de fijación al antígeno. Por ejemplo, en una forma de realización de la invención, se proporciona un anticuerpo contra Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende las 6 regiones de CDR de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en ADT1-4-105, ADT1-4-107, ADT1-4-110, ADT1-4-112, ADT1-4-117, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-139, ADT1-4-4, ADT1-4-143, ADT1-4-53, ADT1-4-173, ADT1-4-2, ADT1-4-8, ADT1-4-82, ADT1-4-83, ADT1-4-3, ADT1-4-84, ADT1-4-86, ADT1-4-95, ADT1-4-1, ADT1-4-6, ADT1-4-138, ADT1-7-10, ADT1-7-15, ADT1-7-17, ADT1-7-18, ADT1-7-19, ADT1-7-20, ADT1-7-22, ADT1-7-23, ADT1-7-42, ADT1-7-3 y ADT1-7-61, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este tiene hasta 10 sustituciones de aminoácidos a lo largo de todas sus regiones de CDR, adecuadamente hasta 5 sustituciones de aminoácidos o hasta 2 sustituciones de aminoácidos. En una forma de realización adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende las secuencias de VH y VL de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en ADT1-4-105, ADT1-4-107, ADT1-4-110, ADT1-4-112, ADT1-4-117, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-139, ADT1-4-4, ADT1-4-143, ADT1-4-53, ADT1-4-173, ADT1-4-2, ADT1-4-8, ADT1-4-82, ADT1-4-83, ADT1-4-3, ADT1-4-84, ADT1-4-86, ADT1-4-95, ADT1-4-1, ADT1-4-6, ADT1-4-138, ADT1-7-10, ADT1-7-15, ADT1-7-17, ADT1-7-18, ADT1-7-19, ADT1-7-20, ADT1-7-22, ADT1-7-23, ADT1-7-42, ADT1-7-3 y ADT1-7-61, en donde el anticuerpo tiene hasta 10 sustituciones de aminoácidos a lo largo de sus secuencias de VH y VL, adecuadamente hasta 5 sustituciones de aminoácidos o hasta 2 sustituciones de aminoácidos. En aun otra forma de realización de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en ADT1-4-105, ADT1-4-107, ADT1-4-110, ADT1-4-112, ADT1-4-117, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-139, ADT1-4-4, ADT1-4-143, ADT1-4-53, ADT1-4-173, ADT1-4-2, ADT1-4-8, ADT1-4-82, ADT1-4-83, ADT1-4-3, ADT1-4-84, ADT1-4-86, ADT1-4-95, ADT1-4-1, ADT1-4-6, ADT1-4-138, ADT1-7-10, ADT1-7-15, ADT1-7-17, ADT1-7-18, ADT1-7-19, ADT1-7-20, ADT1-7-22, ADT1-7-23, ADT1-7-42, ADT1-7-3 y ADT1-7-61, en donde el anticuerpo tiene sustituciones de aminoácidos, adecuadamente hasta 5 sustituciones de aminoácidos o hasta 2 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones son por supuesto sustituciones con respecto a las secuencias

originales de la cadena variable o CDR del anticuerpo inicial.

En algunas formas de realización, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la región o regiones de CDR. En otras formas de realización, la una o más sustituciones de aminoácidos están en las regiones de marco, es decir, en las cadenas pesadas y livianas variables, pero en la región o regiones de CDR. En otras formas de realización, la una o más sustituciones de aminoácidos pueden estar en cualquier posición en las regiones pesada variable y/o liviana variable. En algunas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos no se producen en una secuencia de CDR.

En algunas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos no afectan negativamente la afinidad y/o especificidad de fijación del anticuerpo. En consecuencia, el anticuerpo variante puede tener un perfil funcional igual (o sustancialmente igual) o superior al del anticuerpo del cual deriva.

En algunas formas de realización, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad de fijación del anticuerpo a un antígeno particular. Por ejemplo, en formas de realización de la invención relacionadas con la mutagénesis de la serina en la posición 74 de la (región variable de la) cadena liviana, se puede realizar una sustitución para aumentar la reactividad cruzada del anticuerpo con el homólogo de *Macaca fascicularis* del antígeno humano contra el cual se preparó el anticuerpo. A diferencia de otras sustituciones descritas anteriormente, esta sustitución puede ser preferentemente no conservadora. En algunas formas de realización, la sustitución puede ser una sustitución de la serina en la posición 74 por un aminoácido no polar (por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, metionina, leucina e isoleucina). Alternativamente, la serina puede estar sustituida por un aminoácido que no es de la línea germinal humana (por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina y valina). En algunas formas de realización, la serina puede estar sustituida por un aminoácido que no es de la línea germinal humana y que no es polar, es decir, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, valina, metionina, leucina e isoleucina. En algunas formas de realización, la serina puede estar sustituida con una leucina.

Epítopos

En la presente se proporcionan anticuerpos multiespecíficos (o fragmentos de fijación al antígeno de estos) que se fijan a un epítopo de la cadena Vδ1 de un TCR γδ. Tal fijación puede tener opcionalmente un efecto sobre la actividad de TCR γδ, tal como activación. Los anticuerpos multiespecíficos de la invención son específicos para la cadena Vδ1 de un TCR γδ, y no se fijan a epítopos de otros antígenos, tales como la cadena Vδ2 de un TCR γδ o la cadena Vδ3 de un TCR

γδ. Los anticuerpos de la presente invención pueden considerarse anticuerpos agonistas, al menos con respecto al efecto agonista producido sobre las células Vδ1 tras la fijación.

En una forma de realización, el epítopo puede ser un epítopo activador de un linfocito T γδ. Un epítopo "activador" puede incluir, por ejemplo, la estimulación de una función de TCR, tal como desgranulación celular, regulación descendente de TCR, citotoxicidad, proliferación, movilización, supervivencia aumentada o resistencia al agotamiento, señalización intracelular, secreción de citocinas o factor de crecimiento, cambio fenotípico o un cambio en la expresión génica. Por ejemplo, la fijación del epítopo activador puede estimular la expansión (es decir, proliferación) de la población de linfocitos T γδ, preferentemente la población de linfocitos T Vδ1+. En consecuencia, estos anticuerpos pueden usarse para modular la activación de linfocitos T γδ, y, por lo tanto, para modular la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, en una forma de realización, la fijación del epítopo activador regula de manera descendente el TCR γδ. En una forma de realización adicional o alternativa, la fijación del epítopo activador activa la desgranulación del linfocito T γδ. En otra forma de realización adicional o alternativa, la fijación del epítopo activador promueve la inactivación mediada por linfocitos T γδ.

En algunas formas de realización, un epítopo activador de TRDV1 es uno que, tras fijarse a un anticuerpo, da como resultado la regulación descendente del receptor y activa opcionalmente la célula Vδ1. En algunas formas de realización, el epítopo activador es uno que regula de manera ascendente la expresión de marcadores de la activación sobre la célula Vδ1, por ejemplo, CD107a, CD25, CD69 y/o Ki67. En algunas formas de realización, el epítopo activador es uno que regula de manera ascendente la expresión de marcadores de la activación sobre la célula Vδ1, por ejemplo, CD107 y CD25, y opcionalmente CD69 y/o Ki67. En algunas formas de realización, la regulación ascendente del uno o más marcadores de la activación (tales como CD107a) puede ser regulación ascendente en presencia de células cancerosas. En formas de realización preferidas de la invención, los anticuerpos se fijan a epítopos activadores de TRDV1, en particular a través del dominio de fijación a TRDV1.

Como los receptores de linfocitos T están a menudo en complejo con otras proteínas, la regulación descendente del receptor de linfocitos T a través de la fijación del anticuerpo Vδ1 puede causar la regulación descendente de otras proteínas asociadas con el receptor de linfocitos T (es decir, la fijación del anticuerpo Vδ1 causa la regulación descendente del complejo de receptor de linfocitos T). Por ejemplo, en algunas formas de realización, un epítopo activador de TRDV1 es uno que, tras la fijación, regula de manera descendente el complejo de receptor TCR/CD3. De esta manera, los anticuerpos de la invención pueden causar la regulación descendente indirecta de las proteínas de la superficie celular que no están fijadas al anticuerpo, sino que forman un complejo con el receptor de linfocitos T. Dado que los linfocitos T que expresan cadenas gamma delta 1 (es

decir, células Vδ1) representan solo una cantidad pequeña de la población total de linfocitos T, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden usarse para regular de manera descendente y selectiva (e indirecta) las proteínas en el complejo de TCR, tales como CD3, al regular estas solo de manera descendente en las células Vδ1.

En algunas formas de realización, un epítopo que activa el complejo de receptor de linfocitos T es uno que, tras la activación, regula de manera descendente el complejo de receptor de linfocitos T sin regular de manera descendente las moléculas de CD3 no asociadas con dicho complejo de TCR de TRDV1.

El epítopo está preferentemente compuesto de o consiste en al menos una porción extracelular, soluble, hidrófila o externa de la cadena Vδ1 de un TCR γδ.

En particular, el epítopo no comprende o consiste en un epítopo encontrado en una región hipervariable de la cadena Vδ1 del TCR γδ, en particular CDR3 de la cadena Vδ1. En una forma de realización preferida, el epítopo está dentro de la región no variable de la cadena Vδ1 del TCR γδ. Se apreciará que dicha fijación permite el reconocimiento único de la cadena Vδ1 sin restricción de las secuencias del TCR que son altamente variables (en particular CDR3). Se pueden reconocer de esta manera diversos complejos de TCR γδ que reconocen el antígeno, solamente por la presencia de la cadena Vδ1. Como tal, se apreciará que cualquier TCR γδ que comprenda la cadena Vδ1 puede ser reconocido mediante el uso de los anticuerpos multiespecíficos como se definen en la presente, sin importar la especificidad del TCR γδ. En una forma de realización, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 1-24 y/o 35-90 de SEQ ID NO: 272, por ejemplo, las porciones de la cadena Vδ1 que no son parte de las secuencias de CDR1 y/o CDR3. En una forma de realización, el epítopo no comprende o consiste en residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 91-105 (CDR3) de SEQ ID NO: 272.

En algunas formas de realización, el epítopo comprende o consiste en aminoácidos en la secuencia de CDR2 de TRDV-1.

De una manera similar a los linfocitos T αβ bien caracterizados, los linfocitos T γδ utilizan un conjunto distinto de genes variables (V), de diversidad (D), de unión (J) y constantes (C) redispuestos somáticamente, aunque los linfocitos T γδ contienen menos segmentos V, D y J que los linfocitos T αβ. En una forma de realización, el epítopo de Vδ1 fijado por los anticuerpos multiespecíficos (o fragmentos de fijación al antígeno de estos) no comprende o consiste en un epítopo encontrado en la región J de la cadena Vδ1 (por ejemplo, una de las cuatro regiones J codificadas en la línea germinal de la cadena delta uno humana: SEQ ID NO: 301 (J1*0) o 302 (J2*0) o 303 (J3*0) o 304 (J4*0)) o en la región C de la cadena Vδ1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 305 (C1*0) que contiene las regiones yuxtamembrana/transmembrana del terminal C). En una forma de

realización, el epítopo de Vδ1 fijado por los anticuerpos multiespecíficos (o fragmentos de fijación al antígeno de estos) no comprende o consiste en un epítopo encontrado en la secuencia líder del terminal N de la cadena Vδ1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 299). Por lo tanto, el anticuerpo o fragmento puede fijarse solamente en la región V de la cadena Vδ1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 300). Por lo tanto, en una forma de realización, el epítopo consiste en un epítopo en la región V del TCR γδ (por ejemplo, residuos de aminoácidos 1-90 de SEQ ID NO: 272).

Se hace referencia al epítopo en relación con la secuencia de Vδ1 derivada de la secuencia descrita en Luoma *et al*. (2013) *Immunity* 39: 1032-1042, y las entradas del RCSB Protein Data Bank: 3OMZ, mostradas como SEQ ID NO: 272:

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSDEQNAKS GRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGESLTRADKLIFGKGTRVTVEPNIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESS (SEQ ID NO: 272)

SEQ ID NO: 272 representa un TCR soluble que comprende o que consiste en una región V (también denominada dominio variable), una región D, una región J y una región constante de TCR. La región V comprende o consiste en los residuos de aminoácidos 1-90, la región D comprende o consiste en los residuos de aminoácidos 91-104, la región J comprende o consiste en los residuos de aminoácidos 105-115 y la región constante (derivada del receptor alfa de linfocitos T) comprende o consiste en los residuos de aminoácidos 116-209. Dentro de la región V, CDR1 se define como los residuos de aminoácidos 25-34 de SEQ ID NO: 272, CDR2 se define como los residuos de aminoácidos 50-54 de SEQ ID NO: 272, y CDR3 se define como los residuos de aminoácidos 93-104 de SEQ ID NO: 272 (Xu *et al.*, PNAS USA 108(6):2414-2419 (2011)).

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a un epítopo de una cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ que comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos:

(i) 3-20 de SEQ ID NO: 272; y/o

(ii) 37-77 de SEQ ID NO: 272.

En una forma de realización adicional, los anticuerpos multiespecíficos reconocen adicionalmente la región V polimórfica que comprende o consiste en el epítopo de los residuos de aminoácidos 1-90 de SEQ ID NO: 306. Por lo tanto, los aminoácidos 1-90 de SEQ ID NO: 272 y la secuencia variante de la línea germinal polimórfica (aminoácidos 1-90 de SEQ ID NO: 306) pueden considerarse intercambiables al definir los epítopos descritos en la presente. Los estudios presentados en la presente demostraron que los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden reconocer ambas variantes de esta secuencia de la línea germinal. A modo de ejemplo,

cuando se indica que los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se definen en la presente reconocen epítopos que comprenden o consisten en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 1-24 y/o 35-90 de SEQ ID NO: 272, reconocen adicionalmente epítopos equivalentes (es decir, en la misma posición) en SEQ ID NO: 306.

En una forma de realización, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos reconocen uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 1-90 de SEQ ID NO: 272. Más específicamente, en una forma de realización, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se definen en la presente reconocen un epítopo de la línea germinal humana en donde dicha línea germinal codifica una alanina (A) o valina (V) en la posición 71 de SEQ ID NO: 272.

En una forma de realización, el epítopo comprende o consiste en uno o más, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más, residuos de aminoácidos dentro de las regiones descritas.

En una forma de realización adicional, el epítopo comprende o consiste en uno o más (tal como 5 o más, tal como 10 o más) residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 3-20 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización alternativa, el epítopo comprende o consiste en uno o más (tal como 5 o más, tal como 10 o más) residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37-77 de SEQ ID NO: 272 (tal como las regiones de aminoácidos 50-54). En aun otra forma de realización, el epítopo comprende o consiste en uno o más (tal como 5 o más, tal como 10 o más) residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 3-20 (tal como 5-20 o 3-17) y uno o más (tal como 5 o más, tal como 10 o más) residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37-77 (tal como 62-77 o 62-69) de SEQ ID NO: 272.

Se entenderá además que dicho anticuerpo (o fragmento de fijación al antígeno de este) no necesita fijarse a todos los aminoácidos dentro del rango definido. Tales epítopos pueden denominarse epítopos lineales. Por ejemplo, un anticuerpo que se fija a un epítopo que comprende o que consiste en residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 5-20 de SEQ ID NO: 272 puede fijarse solamente con uno o más de los residuos de aminoácidos en dicho rango, por ejemplo, los residuos de aminoácidos en cada extremo del rango (es decir, aminoácidos 5 y 20), que incluyen opcionalmente los aminoácidos dentro del rango (es decir, aminoácidos 5, 9, 16 y 20).

En una forma de realización, el epítopo comprende o consiste en al menos uno de los residuos de aminoácidos 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 o 77 de SEQ ID NO: 272. En formas de realización adicionales, el epítopo comprende o consiste en uno,

dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 o 77 de SEQ ID NO: 272.

En una forma de realización, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las siguientes regiones de aminoácidos de SEQ ID NO: 272:

(i) 3-17;

(ii) 5-20;

(iii) 37-53;

(iv) 50-64;

(v) 59-72;

(vi) 59-77;

(vii) 62-69; y/o

(viii) 62-77.

En formas de realización adicionales, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos: 5-20 y 62-77 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental E07, tales como variantes con maduración de afinidad de estos); 50-64 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental C08, tales como variantes con maduración de afinidad de estos); 37-53 y 59-72 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental G04, tales como variantes con maduración de afinidad de estos); 59-77 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental C05, tales como variantes con maduración de afinidad de estos); o 3-17 y 62-69 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental E01, tales como variantes con maduración de afinidad de estos), de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización adicional, el epítopo consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos: 5-20 y 62-77; 50-64; 37-53 y 59-72; 59-77; o 3-17 y 62-69, de SEQ ID NO: 272.

En una forma de realización adicional, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 y 69 de SEQ ID NO: 272, o consiste adecuadamente en los residuos de aminoácidos: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 y 69 de SEQ ID NO: 272 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental E01, tal como variantes con maduración de afinidad de estos). En una forma de realización adicional, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 y 77 de SEQ ID NO: 272, o consiste adecuadamente en los residuos de aminoácidos: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 y 77 de SEQ ID NO: 272 (por ejemplo, entre otras, formas de

realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental E07, tal como variantes con maduración de afinidad de estos). En aun otra forma de realización, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272, o consiste adecuadamente en los residuos de aminoácidos: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental G04, tal como variantes con maduración de afinidad de estos). En una forma de realización adicional, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos: 50, 53, 59, 62 y 64 de SEQ ID NO: 272, o consiste adecuadamente en los residuos de aminoácidos: 50, 53, 59, 62 y 64 de SEQ ID NO: 272 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental C08, tal como variantes con maduración de afinidad de estos). En una forma de realización adicional, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos: 59, 60, 68 y 72 de SEQ ID NO: 272, o consiste adecuadamente en los residuos de aminoácidos: 59, 60, 68 y 72 de SEQ ID NO: 272 (por ejemplo, entre otras, formas de realización relacionadas con anticuerpos derivados del clon parental C05, tal como variantes con maduración de afinidad de estos).

En una forma de realización, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37-53 y/o 59-77 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización adicional, el epítopo consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37-53 y 59-77 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización adicional alternativa, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37-53 o 59-77 de SEQ ID NO: 272. Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que tienen tales epítopos pueden tener algunas o la totalidad de las secuencias de G04, o tales anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden derivarse de G04. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que tienen una o más secuencias de CDR de G04 o una o ambas de las secuencias de VH y VL de G04 pueden fijarse a tales epítopos.

En una forma de realización, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 5-20 y/o 62-77 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización adicional, el epítopo consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 5-20 y 62-77 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización adicional alternativa, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 5-20 o 62-77 de SEQ ID NO: 272. Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que tienen tales epítopos pueden tener algunas o la totalidad de las secuencias de E07, o tales anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden derivarse de E07. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o

fragmentos de fijación al antígeno de estos que tienen una o más secuencias de CDR de E07 o una o ambas de las secuencias de VH y VL de E07 pueden fijarse a tales epítopos.

En una forma de realización, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 50-64 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización adicional, el epítopo consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 50-64 de SEQ ID NO: 272. Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que tienen tales epítopos pueden tener algunas o la totalidad de las secuencias de C08, o tales anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden derivarse de C08. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que tienen una o más secuencias de CDR de C08 o una o ambas de las secuencias de VH y VL de C08 pueden fijarse a tales epítopos.

En una forma de realización, el epítopo comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 59-72 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización adicional, el epítopo consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 59-72 de SEQ ID NO: 272. Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que tienen tales epítopos pueden tener algunas o la totalidad de las secuencias de C05, o tales anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden derivarse de C05. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos que tienen una o más secuencias de CDR de C05 o una o ambas de las secuencias de VH y VL de C05 pueden fijarse a tales epítopos.

En una forma de realización, el epítopo no comprende o consiste en residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 11-21 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización, el epítopo no comprende o consiste en residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 21-28 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización, el epítopo no comprende o consiste en residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 59 y 60 de SEQ ID NO: 272. En una forma de realización, el epítopo no comprende o consiste en residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 67-82 de SEQ ID NO: 272.

Los epítopos de anticuerpos con maduración de afinidad serán generalmente iguales que los epítopos identificados en la presente para el clon parental. En el caso de los epítopos en TRDV1 de *Macaca fascicularis*, las posiciones de los epítopos de los anticuerpos con maduración de afinidad tendrán generalmente las mismas posiciones que los epítopos identificados para el clon parental correspondiente. La referencia a "posiciones" es necesaria ya que la persona del oficio de nivel medio apreciaría que la identidad de algunos de los aminoácidos en los epítopos es diferente en la TRDV1 humana. A pesar de estas variaciones entre TRDV1 humana y de *Macaca fascicularis*, tales anticuerpos aún son capaces de fijarse específicamente a ambos antígenos.

En una forma de realización, el epítopo no es el mismo epítopo al que se fija un anticuerpo anti-Vδ1 disponible en el comercio, tal como TS-1 o TS8.2. Como se describe en WO2017197347, se detectó la fijación de TS-1 y TS8.2 a TCR solubles cuando la cadena δ1 incluía secuencias Vδ1 J1 y Vδ1 J2, pero no a la cadena Vδ1 J3, lo que indica que la fijación de TS-1 y TS8.2 implicó residuos cruciales en las regiones delta J1 y delta J2.

Las referencias a "dentro de" en la presente incluyen los extremos del rango definido. Por ejemplo, "dentro de las regiones de aminoácidos 5-20" se refiere a todos los residuos de aminoácidos desde el residuo 5 inclusive hasta el residuo 20 inclusive.

En la técnica se conocen diversas técnicas para determinar a qué epítopo se fija un anticuerpo. Las técnicas de ejemplo incluyen, por ejemplo, ensayos de bloqueo cruzado de rutina, análisis mutacional de barrido de alanina, análisis de transferencias de péptidos, análisis de escisión de péptidos, estudios cristalográficos y análisis de NMR. Además, se pueden emplear métodos tales como escisión de epítopos, extracción de epítopos y modificación química de antígenos. Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado mediante espectrometría de masas (como se describe en el Ejemplo 9). En término generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica etiquetar con deuterio la proteína de interés, seguido de fijación del anticuerpo a la proteína etiquetada con deuterio. A continuación, el complejo proteína/anticuerpo se transfiere a agua y los protones intercambiables dentro de los aminoácidos que están protegidos por el complejo de anticuerpo se someten a un retrocambio de deuterio a hidrógeno a una velocidad más lenta que los protones intercambiables dentro de aminoácidos que no son parte de la interfaz. Como resultado, los aminoácidos que forman parte de la interfaz proteína/anticuerpo pueden retener deuterio y, por lo tanto, exhibir una masa relativamente mayor en comparación con los aminoácidos no incluidos en la interfaz. Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión de proteasa y análisis de espectrometría de masas, lo que revela los residuos etiquetados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los cuales interactúa el anticuerpo.

Por lo tanto, los anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de fijación al antígeno se fijan específicamente de manera adecuada tanto a TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 y la variante polimórfica de SEQ ID NO: 306) como a un ortólogo en *Macaca fascicularis*, TRDV1 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 308, ver también UniProtKB - G7P9S6 (G7P9S6_MACFA)). En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos son anticuerpos derivados de G04 que se fijan específicamente tanto a TRDV1 humana como a TRDV1 de *Macaca fascicularis*. Se conjetura que los epítopos fijados a los anticuerpos multiespecíficos de la invención (por ejemplo, entre otros, los que se fijan en una región dentro de

los residuos de aminoácidos 37 a 77 de cualquiera de SEQ ID NO: 272, 306 o 308) pueden ser particularmente ventajosos, ya que permiten la provisión de anticuerpos anti-Vδ1 que son específicos para Vδ1 (es decir, no se fijan a antígenos similares, tales como Vδ2 o Vδ3) pero que también proporcionan reactividad cruzada con variantes polimórficas de Vδ1 (es decir TRDV1 SEQ ID NO: 272 y TRDV1 SEQ ID NO: 306, a pesar del polimorfismo en el residuo de la posición 20 y de que este se identifique como un posible residuo de contacto o esté cerca de un residuo de contacto identificado para algunos anticuerpos) y proporcionan reactividad cruzada entre Vδ1 humana y de *Macaca fascicularis* (a pesar de que todos los residuos 42, 50, 54, 59, 60, 68, 73, 75 y 76 que ocurren dentro de la región de los residuos de aminoácidos 37 a 77 de SEQ ID NO: 272 y 308 son diferentes en las secuencias de TRDV1 humana y de *Macaca fascicularis*).

Epítopos de anticuerpos derivados de ADT1-4

Los anticuerpos derivados de ADT1-4 se fijan al mismo epítopo, o sustancialmente el mismo epítopo, que el anticuerpo parental ADT1-4. En consecuencia, en algunas formas de realización, en particular las relacionadas con anticuerpos derivados de, o relacionados con, el anticuerpo parental ADT1-4, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno se fija a un epítopo que comprende o que consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37 a 77, por ejemplo, dentro de las regiones de aminoácidos 37-53 y/o 59-77, de SEQ ID NO: 272 (o SEQ ID NO: 306). En algunas formas de realización, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272 (o SEQ ID NO: 306). En algunas formas de realización, el epítopo consiste en los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272 (o SEQ ID NO: 306).

Los anticuerpos derivados de ADT1-4 también se fijan al epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de *Macaca fascicularis* de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ, es decir, TRDV1 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 308). Por lo tanto, en algunas formas de realización, en particular las relacionadas con anticuerpos derivados de, o relacionados con, el anticuerpo parental G04, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno se fija a un epítopo que comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37 a 77, por ejemplo, dentro de las regiones de aminoácidos 37-53 y/o 59-77, de SEQ ID NO: 308. En algunas formas de realización, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 308. En algunas formas de realización, el epítopo consiste en los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 308.

Dada la reactividad cruzada de los anticuerpos derivados de ADT1-4 en particular, y la capacidad de los anticuerpos divulgados en la presente para fijarse a la variante polimórfica de

TRDV1, en algunas formas de realización, en particular las relacionadas con anticuerpos derivados de, o relacionados con, el anticuerpo parental G04, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno se fija a un epítopo que comprende o consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37 a 77, por ejemplo, dentro de las regiones de aminoácidos 37-53 y/o 59-77, de SEQ ID NO: 272, 306 y 308. En algunas formas de realización, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272, 306 y 308. En algunas formas de realización, el epítopo consiste en los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272, 306 y 308.

La provisión de anticuerpos que comprenden o consisten en epítopos tales como los descritos anteriormente sin dejar de proporcionar reactividad cruzada entre secuencias de TRDV1 humana y de *Macaca fascicularis* es sorprendente, dada la ubicación de las variantes de aminoácidos en estas secuencias de las dos especies.

Epítopos de anticuerpos derivados de ADT1-7

Los anticuerpos derivados de ADT1-7 se fijan al mismo epítopo, o sustancialmente el mismo epítopo, que el anticuerpo parental ADT1-7. En consecuencia, en algunas formas de realización, en particular las relacionadas con anticuerpos derivados de, o relacionados con, el anticuerpo parental ADT1-7, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno se fija a un epítopo que comprende o que consiste en uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 5-20 y/o 62-77 de SEQ ID NO: 272 (o SEQ ID NO: 306). En alguna forma de realización, el epítopo comprende o consiste en los residuos de aminoácidos 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 y 77 de SEQ ID NO: 272 (o SEQ ID NO: 306). En algunas formas de realización, el epítopo consiste en los residuos de aminoácidos 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 y 77 de SEQ ID NO: 272 (o SEQ ID NO: 306).

Marco y otras secuencias

Adecuadamente, cada una de las regiones de VH y VL de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de la invención comprende cuatro regiones de marco (FR1-FR4). En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la región de marco en cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 25 (por ejemplo, en el caso de secuencias variables de la cadena liviana derivadas de G04), SEQ ID NO: 27 a 50 (por ejemplo, en el caso de secuencias variables de la cadena pesada derivadas de G04), SEQ ID NO: 107 a 117 (por ejemplo, en el caso de la secuencia variable de la cadena liviana derivada de E07) o SEQ ID NO: 119 a 129 (por ejemplo, en el caso de la secuencia variable de la cadena liviana derivada de E07). En una forma de

realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, tal como al menos 95 %, 97 % o 99 % de identidad de secuencia con la región de marco en cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 25 (por ejemplo, en el caso de secuencias variables de la cadena liviana derivadas de G04), SEQ ID NO: 27 a 50 (por ejemplo, en el caso de secuencias variables de la cadena pesada derivadas de G04), SEQ ID NO: 107 a 117 (por ejemplo, en el caso de la secuencia variable de la cadena liviana derivada de E07) o SEQ ID NO: 119 a 129 (por ejemplo, en el caso de la secuencia variable de la cadena liviana derivada de E07). En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que comprende una secuencia en cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 25 (por ejemplo, en el caso de secuencias variables de la cadena liviana derivadas de G04), SEQ ID NO: 27 a 50 (por ejemplo, en el caso de secuencias variables de la cadena pesada derivadas de G04), SEQ ID NO: 107 a 117 (por ejemplo, en el caso de la secuencia variable de la cadena liviana derivada de E07) o SEQ ID NO: 119 a 129 (por ejemplo, en el caso de la secuencia variable de la cadena liviana derivada de E07). En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que consiste en una secuencia en cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 25 (por ejemplo, en el caso de secuencias variables de la cadena liviana derivadas de G04), SEQ ID NO: 27 a 50 (por ejemplo, en el caso de secuencias variables de la cadena pesada derivadas de G04), SEQ ID NO: 107 a 117 (por ejemplo, en el caso de la secuencia variable de la cadena liviana derivada de E07) o SEQ ID NO: 119 a 129 (por ejemplo, en el caso de la secuencia variable de la cadena liviana derivada de E07).

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este puede comprender una secuencia de HFR1 (es decir, región de marco 1 pesada) que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 170 o 171; una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 172; una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 173; una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 174; una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 175; una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 176; una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 177 o 178; y/o una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 179, 180, 181 o 182.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este puede comprender una secuencia de HFR1 (es decir, región de marco 1 pesada) que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 170 o 171; una secuencia de HFR2 que

comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 172; una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 173; una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 174; una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 175; una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 176; una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 177; y/o una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 179, 180, 181 o 182.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este puede comprender una secuencia de HFR1 (es decir, región de marco 1 pesada) que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 170 o 171; una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 172; una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 173; una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 174; una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 175; una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 176; una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 177; y/o una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 179 o 181.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este puede comprender una secuencia de HFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 189; una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 190; una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 191; una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 192; una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 193 y 194; una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 195; una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 196; y una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 197.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este puede comprender una secuencia de HFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 189; una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 190; una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 191; una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 192; una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 193; una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 195; una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 196; y una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 197.

En el caso de fragmentos que comprenden tanto la región VH como la región VL, estas pueden estar asociadas de manera covalente (por ejemplo, mediante enlaces disulfuro o un ligador) o no covalente. El fragmento de anticuerpo descrito en la presente puede comprender un scFv, es decir, un fragmento que comprende una región VH y una región VL unidas por un ligador. En una forma de realización, las regiones VH y VL están unidas por un ligador polipeptídico (por ejemplo, sintético). El ligador polipeptídico puede comprender un ligador $(Gly_4Ser)_n$, donde n = de 1 a 8, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 7. El ligador polipeptídico puede comprender un ligador $[(Gly_4Ser)_n(Gly_3AlaSer)_m]_p$, donde n = de 1 a 8, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 7, m = de 1 a 8, por ejemplo, 0, 1, 2 o 3, y p = de 1 a 8, por ejemplo, 1, 2 o 3. En una forma de realización adicional, el ligador comprende SEQ ID NO: 291. En una forma de realización adicional, el ligador consiste en SEQ ID NO: 291.

La persona del oficio de nivel medio entenderá que se pueden diseñar y elaborar constructos de scFv que incluyan modificaciones en el terminal N y el terminal C para ayudar con la traducción, purificación y detección. Por ejemplo, en el terminal N de una secuencia de scFv, un residuo de aminoácido de metionina y/o alanina adicional se puede incluir adelante de las secuencias de VH canónicas (por ejemplo, QVQ o EVQ de inicio). En el terminal C (es decir, el terminal C del final de la secuencia de dominio VL madura canónica según la definición de IMGT) se pueden incluir secuencias adicionales, tales como (i) una secuencia parcial del dominio constante y/o (ii) secuencias sintéticas adicionales que incluyen etiquetas, tales como etiquetas His y etiquetas Flag, para ayudar con la purificación y detección (por ejemplo, las etiquetas de cualquiera de SEQ ID NO: 292 a 295).

Como se describe en la presente, los anticuerpos pueden estar en cualquier formato. En una forma de realización preferida, el anticuerpo es un formato de IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana) (es decir, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 humano).

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región constante de la cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 296 o SEQ ID NO: 307 (o una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 296 o SEQ ID NO: 307) y/o una región constante de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 297 o SEQ ID NO: 298 (o una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 297 o SEQ ID NO: 298). En algunas formas de realización, la función efectora de la región constante de la cadena pesada

puede reducirse o deshabilitarse (mutaciones que deshabilitan la función efectora). La persona del oficio de nivel medio conoce mutaciones adecuadas para atenuar las funciones efectoras. Por ejemplo, las mutaciones L235A y/o G237A ("LAGA") o las mutaciones L234A y/o L235A ("LALA") de acuerdo con la numeración EU. Por ejemplo, en una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región constante de la cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 296 y/o una región constante de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 297 o SEQ ID NO: 298.

Anticuerpos que compiten

En una forma de realización, el anticuerpo se fija al mismo epítopo o a esencialmente el mismo epítopo que, o compite con, un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente. Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se fija al mismo epítopo que, o compite por la fijación con, un anticuerpo anti-Vδ1 de referencia mediante el uso de métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se fija al mismo epítopo que un anticuerpo anti-Vδ1 de referencia de la invención, el anticuerpo de referencia se puede fijar a una proteína o péptido Vδ1 en condiciones de saturación. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para fijarse a la cadena Vδ1. Si el anticuerpo de prueba puede fijarse a Vδ1 después de la fijación por saturación con el anticuerpo anti-Vδ1 de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se fija a un epítopo diferente que el anticuerpo anti-Vδ1 de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no puede fijarse a la cadena Vδ1 después de la fijación por saturación con el anticuerpo anti-Vδ1 de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede fijarse al mismo epítopo al que se fija el anticuerpo anti-Vδ1 de referencia de la invención.

La presente invención también incluye anticuerpos anti-Vδ1 que compiten por la fijación a Vδ1 con un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente, o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de los anticuerpos de ejemplo descritos en la presente. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos competitivos con el anticuerpo de la presente invención con el fin de determinar qué proteínas, anticuerpos y otros antagonistas compiten por la fijación a la cadena Vδ1 con el anticuerpo de la presente invención y/o comparten el epítopo. Las personas del oficio de nivel medio conocen estos ensayos; estos evalúan la competencia entre antagonistas o ligandos en una cantidad limitada de sitios de fijación en una proteína, por ejemplo, Vδ1. El anticuerpo (o fragmento de fijación al antígeno de este) se inmoviliza o insolubiliza antes o después de la competencia y la muestra fijada a la cadena Vδ1 se separa de la muestra no fijada, por ejemplo, mediante decantación (donde el anticuerpo estaba preinsolubilizado) o mediante centrifugación (donde el anticuerpo se precipita antes de la reacción de competencia). Además, la fijación competitiva se puede determinar al determinar si la función

está alterada por la fijación o falta de fijación del anticuerpo a la proteína, por ejemplo, si la molécula de anticuerpo inhibe o potencia la actividad enzimática, por ejemplo, de una etiqueta. Se pueden utilizar ELISA y otros ensayos funcionales, como se conocen en la técnica y se describen en la presente.

Dos anticuerpos se fijan al mismo epítopo o epítopos superpuestos si cada uno inhibe (bloquea) competitivamente la fijación del otro al antígeno diana. Es decir, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la fijación del otro en al menos 50 %, pero preferentemente, 75 %, 90 % o incluso 99 %, según se mide en un ensayo de fijación competitiva. Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno diana que reducen o eliminan la fijación de un anticuerpo reducen o eliminan la fijación del otro.

Luego se puede llevar a cabo experimentación de rutina adicional (por ejemplo, análisis de fijación y mutación de péptidos) para confirmar si la falta de fijación observada del anticuerpo de prueba se debe en efecto a la fijación al mismo epítopo al que se fija el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es la causa de la falta de fijación observada. Se pueden realizar experimentos de este tipo con ELISA, RIA, resonancia de plasmones superficiales, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de fijación a anticuerpos disponible en la técnica.

Fijación de anticuerpos y propiedades farmacológicas de los anticuerpos

Los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden tener propiedades de fijación y/o farmacológicas favorables, por ejemplo, como se describen a continuación.

En algunas formas de realización, la afinidad de fijación del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este se establece al recubrir con el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este directa o indirectamente (por ejemplo, mediante captura con un Fc anti-IgG humana) la superficie de un sensor (por ejemplo, un chip de alta capacidad de amina o equivalente), en donde la diana fijada al anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este (es decir, la cadena Vδ1 de un TCR γδ o EGFR) se hace fluir sobre el chip para detectar la fijación. Adecuadamente, se usa un instrumento MASS-2 (que también puede denominarse Sierra SPR-32) a 25 °C en PBS + 0,02 % de amortiguador de corrida Tween 20 a 30 µl/min.

En la presente se describen otros ensayos que pueden usarse para definir la función del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de fijación al antígeno de este descrito en la presente puede evaluarse mediante acoplamiento de TCR γδ, por ejemplo, al medir la regulación descendente del TCR γδ tras la fijación del anticuerpo. Se puede medir la expresión superficial del TCR γδ después de la aplicación del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este (presentado opcionalmente en la superficie de una célula), por ejemplo, mediante

citometría de flujo. El anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este descrito en la presente también puede evaluarse al medir la desgranulación de linfocitos T γδ. Por ejemplo, la expresión de CD107a, un marcador de la desgranulación celular, puede medirse después de la aplicación del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este (presentado opcionalmente en la superficie de una célula) a linfocitos T γδ, por ejemplo, mediante citometría de flujo. El anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este descrito en la presente también puede evaluarse al medir la actividad de inactivación mediada por linfocitos T γδ (para evaluar si el anticuerpo tiene un efecto sobre la actividad de inactivación del linfocito T γδ). Por ejemplo, las células diana pueden incubarse con linfocitos T γδ en presencia del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este (presentado opcionalmente en la superficie de una célula). Después de la incubación, el cultivo puede teñirse con un tinte de viabilidad celular para distinguir entre células diana vivas y muertas. Luego se puede medir la proporción de células muertas, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

Adicionalmente, se describen en la presente ensayos que se pueden usar para definir la función del anticuerpo multiespecífico como se evalúa en ensayos que comprenden una mezcla de al menos dos tipos celulares diferentes que comprenden células TCR γδ+ve y células EGFR+ve separadas. Estos ensayos sirven para destacar adicionalmente algunos de los efectos técnicos sorprendentes de los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente, por medio de los cuales se observan otros efectos mejorados (por ejemplo, regulación descendente de TCR mejorada) al evaluar y definir la función del anticuerpo multiespecífico en ensayos que comprenden tales mezclas de células.

Afinidad de fijación (K_D) con TRDV1 humana

En términos generales, los clones con maduración de afinidad (y los anticuerpos multiespecíficos derivados de dichos clones o relacionados con estos) tendrán mayor afinidad con sus antígenos que los clones parentales. Por ejemplo, la afinidad con TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 o 306) será al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 100 % o al menos 500 % mayor que la afinidad del anticuerpo parental.

Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 o 306) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM, preferentemente menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden definirse adicionalmente como que se fijan a TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 o 306) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 10 nM, preferentemente menor de alrededor de 5 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-4 (por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos de la invención con una región Fab relacionada con, o derivada de, el linaje ADT1-4, por ejemplo, como resultado de la maduración de afinidad o de otro modo), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 100 nM, preferentemente menor de alrededor de 50 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-4 (pero sin incluir ADT1-4-138), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM, preferentemente menor de alrededor de 5 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, los miembros del linaje ADT1-4 ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 y/o ADT1-4-1, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM, preferentemente menor de alrededor de 1 nM.

Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 308) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM, preferentemente menor de alrededor de 50 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-4, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 100 nM, preferentemente menor de alrededor de 50 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, los miembros del linaje ADT1-4 ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 y/o ADT1-4-1, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 50 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, las relacionadas con, o derivadas de, el linaje ADT1-4, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la

invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 100 nM, preferentemente, menor de alrededor de 50 nM, y fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM, preferentemente, menor de alrededor de 50 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-4 (pero sin incluir ADT1-4-138), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM y fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM. Preferentemente, en esta forma de realización, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 5 nM y fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 50 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, los miembros del linaje ADT1-4 ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 y/o ADT1-4-1, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM y fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de 50 nM. Preferentemente, en esta forma de realización, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 1 nM y fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 50 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-7 (por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos de la invención con una región Fab relacionada con, o derivada de, el linaje ADT1-7, por ejemplo, como resultado de la maduración de afinidad o de otro modo), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM, preferentemente menor de alrededor de 5 nM.

Tabla 6: Resumen de las afinidades a TRDV1 humana de anticuerpos multiespecíficos de ejemplo de la invención, según se determina mediante SPR.

Anticuerpo	**Afinidad a Vδ1 (nM)**

ADT1-4-2xLEE	0,416
ADT1-4-6xLEE	3,24
ADT1-4-138xLEE	55

Se demostró que el aumento de la afinidad de fijación con la TRDV1 humana a menos de 10 nM otorga efectos técnicos ventajosos, tal como mayor fijación (MFI), regulación descendente de TCR Vδ1 mejorada, regulación ascendente de CD107A mejorada, mayor citotoxicidad y mayor proliferación (ver la Figura 35L).

Afinidad de fijación (K_D) con EGFR

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden fijarse a EGFR con una K_D menor de alrededor de 150 nM, por ejemplo, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2x747, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2xLEE2 y ADT1-4-2xLEE1.

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden fijarse a EGFR con una K_D menor de alrededor de 20 nM, por ejemplo, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2x747 y ADT1-4-2xLEE3.

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden fijarse a EGFR con una K_D menor de alrededor de 10 nM, por ejemplo, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE y ADT1-4-2x747.

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden fijarse a EGFR con una K_D menor de alrededor de 5 nM, por ejemplo, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE y ADT1-4-2x747.

En cualquier forma de realización, el EGFR puede ser EGFR humano.

En la Tabla 7 se proporciona resumen de las afinidades a EGFR de anticuerpos multiespecíficos de ejemplo de la invención, según se determina mediante SPR.

Tabla 7: Resumen de afinidades con TRDV1 y EGFR

Resultados de afinidad de ejemplo para las moléculas como se indicó (nota: variación interensayo generalmente <2 veces)			
Anticuerpo	**Alias**	**Afinidad con EGFR humano (nM)**	**Afinidad con TRDV1 humana (nM)**
ADT1-4-2/ADT3-3	ADT1-4-2xFS1-65	1,35	0,464
ADT1-4-2/ADT3-1	ADT1-4-2xFS1-67	1,37	0,378
ADT1-4-2/ADT3-2	ADT1-4-2xLEE	1,49	0,416
ADT1-4-2/ADT3-4	ADT1-4-2x747	2,35	0,511
ADT1-4-2/ADT3-7	ADT1-4-2xLEE3	8,63	0,462

ADT1-4-2/ADT3-6	ADT1-4-2xLEE2	19,2	0,818
ADT1-4-2/ADT3-5	ADT1-4-2xLEE1	142	0,883
ADT1-4/ADT3-1	G04xFS1-67	1,14	152
ADT1-4-138/ADT3-2	ADT1-4-138xLEE	2,78	55
ADT1-4-6/ADT3-2	ADT1-4-6xLEE	0,655	3,24
ADT1-4	G04	-	115
ADT1-4-2	-	-	0,522

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden fijarse a TRDV1 con una K_D menor de alrededor de 5 nM y pueden fijarse a EGFR con una K_D menor de alrededor de 150 nM, por ejemplo, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2x747, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2xLEE2 y ADT1-4-2xLEE1.

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden fijarse a TRDV1 con una K_D menor de alrededor de 5 nM y pueden fijarse a EGFR con una K_D menor de alrededor de 20 nM, por ejemplo, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2x747 y ADT1-4-2xLEE3.

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden fijarse a TRDV1 con una K_D menor de alrededor de 5 nM y pueden fijarse a EGFR con una K_D menor de alrededor de 10 nM, por ejemplo, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE y ADT1-4-2x747.

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden fijarse a TRDV1 con una K_D menor de alrededor de 5 nM y pueden fijarse a EGFR con una K_D menor de alrededor de 5 nM, por ejemplo, ADT1-4-2xFS1-65, ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xLEE y ADT1-4-2x747.

Se demostró que el aumento de la afinidad de fijación con EGFR otorga efectos técnicos ventajosos, tal como mayor fijación (MFI), regulación descendente de TCR Vδ1 mejorada, desgranulación mejorada, mayor citotoxicidad, mayor regulación ascendente de 4-1BB y mayor proliferación (ver la Figura 36). Se observó un efecto de agrupamiento en donde los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención con afinidades de medias a altas con EGFR en el rango de alrededor de 1 nM a alrededor de 20 nM de afinidad (ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2LEE2) se agrupan funcionalmente, mientras que la molécula con menor afinidad, de alrededor de 142 nM (ADT1-4-2xLEE1), se ve afectada de manera significativa y es equivalente al control sin fijación (a TCR) en este ensayo. Curiosamente, la fijación a EGFR con la más alta afinidad (menor de alrededor de 2 nM) no otorga los efectos de saturación más altos para la regulación descendente de TCR Vδ1 mejorada, desgranulación mejorada, mayor citotoxicidad, mayor

regulación ascendente de 41BB y mayor proliferación. En cambio, las moléculas con afinidad de rango medio de alrededor de 9 nM-19 nM (ADT1-4-2xLEE3 y ADT1-4-2xLEE2 respectivamente) otorgan los efectos más altos a concentraciones de saturación de los anticuerpos. Este efecto óptimo otorgado por los anticuerpos multiespecíficos de afinidad de rango medio de la presente invención se analiza más adelante en la presente. Los resultados se muestran en la Figura 36.

Aumento o disminución de los dominios de fijación

Los anticuerpos multiespecíficos presentados en la presente comprenden al menos un primer dominio de fijación que se fija al dominio de TRDV1 de TCR Vδ1 y al menos un segundo dominio de fijación que se fija a EGFR. Cada dominio de fijación se fija a su diana con una afinidad de fijación (Kd) diferente. Estas afinidades de fijación se pueden modificar independientemente entre sí. El ajuste ascendente o descendente de las afinidades tanto para el primer dominio de fijación como para el segundo dominio de fijación impacta sobre la funcionalidad y sobre los efectos técnicos otorgados.

Afinidad del primer dominio de fijación (al dominio de TRDV1 de TCR Vδ1):

1) El aumento de la afinidad al primer dominio de fijación (a más de alrededor de 10 nM) puede además potenciar los efectos de estos anticuerpos multiespecíficos en ciertas circunstancias. Esto resulta sorprendente dado que todos los ligandos naturales para el TCR Vδ1 humano informados hasta la fecha exhiben afinidades mucho más bajas que varían de 2,9 uM (MART1) a 900 uM (MICA).

2) El aumento de la concentración de anticuerpos multiespecíficos con afinidades más bajas a TRDV1 (menores de alrededor de 10 nM) puede superar algunas de las actividades más bajas observadas otorgadas por estas moléculas (por ejemplo, efectos proliferativos), aunque, curiosamente, no todos los efectos pueden replicarse mediante concentraciones mayores de la variante de afinidad más baja.

3) Las células cancerosas con una cantidad de copias de TAA mayor pueden además potenciar los efectos observados otorgados por estos anticuerpos multiespecíficos; en particular, de la variante de afinidad más baja (a TRDV1).

Afinidad del segundo dominio de fijación (a EGFR)

1) Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención con afinidades más altas a EGFR se desempeñaron de manera óptima en una cantidad de los estudios exploratorios realizados (ver los Ejemplos 13 a 17).

2) Se observó un efecto de umbral en donde la afinidad con EGFR podría variar entre 1 nM y 20 nM sin un mayor impacto en muchos efectos funcionales (ver los Ejemplos 13 a 17). Este efecto de umbral o de agrupamiento observado en anticuerpos multiespecíficos de afinidad alta a media fue inesperado.

3) Una cantidad de copias de TAA mayor en una línea celular cancerosa supera algunos de los efectos reducidos observados con los anticuerpos multiespecíficos con menor afinidad (con EGFR), aunque, nuevamente, solo en algunas circunstancias (ver los Ejemplos 13 a 17).

4) Algunos anticuerpos multiespecíficos de la invención con una afinidad de rango medio con EGFR (9 nm a 20 nM) se desempeñaron más favorablemente que las variantes con la mayor afinidad (menor de 2 nM) a concentraciones de saturación en algunos casos. Por ejemplo, con concentraciones de anticuerpo en nM, se observó que los anticuerpos multiespecíficos con afinidades de rango medio con EGFR (de alrededor de 8 nM a 20 nM) otorgaron efectos proliferativos mejorados y estados de activación de 41BB en comparación con las variantes de la mayor afinidad (menores de 2 nM, preferentemente menores de 1,5 nM) y las variantes con la menor afinidad (de alrededor de 142 nM) en los ensayos descritos.

El aumento y la disminución de la afinidad proporciona una "caja de herramientas" de anticuerpos multiespecíficos, algunos de los cuales son óptimos para casos de menor cantidad de copias de TAA, otros son óptimos en concentraciones a nM/rango de dosis en ciertas circunstancias y algunos son más selectivos solo en tipos de cáncer con altas cantidades de copias de TAA.

Afinidad con TRDV1	**Afinidad con EGFR**	**Moléculas de ejemplo**	**Posible utilidad**
Mayor afinidad	Mayor afinidad	ADT1-4-2xFS1-65 ADT1-4-2xLEE ADT1-4-2xFS1-67 ADT1-4-2x747	Tratamiento contra tipos de cáncer EGFR positivos; el formato más potente según diversas medidas. Muy eficaz contra células cancerosas con cantidad de copias de EGFR tanto alta como baja según muchas medidas.
Mayor afinidad	Afinidad media	ADT1-4-2xLEE2 ADT1-4-2xLEE3	Tratamiento contra tipos de cáncer EGFR positivos; demuestra agrupación con moléculas con afinidad alta (ver arriba) según varias medidas, aunque potencialmente con formato más potente a concentraciones de saturación (tal como efectos

			proliferativos otorgados a células Vδ1+)
Mayor afinidad	Menor afinidad	ADT1-4-2xLEE1	Tratamiento contra tipos de cáncer EGFR positivos. Potencialmente más selectivo contra células cancerosas con una alta cantidad de copias de EGFR. Este formato sesgará probablemente la distribución hacia las células Vδ1+.
Menor afinidad	Mayor afinidad	ADT1-4-6xLEE	Tratamiento contra tipos de cáncer EGFR positivos. Potencialmente más selectivo contra células cancerosas con una alta cantidad de copias de EGFR. Equipotente con moléculas superiores/superiores según ciertas medidas en saturación (por ejemplo, efectos proliferativos otorgados sobre células Vδ1+). Este formato sesgará con mayor probabilidad la distribución hacia las células portadoras de EGFR.

Concentraciones de inhibición (IC50)

Regulación descendente de TCR

La regulación descendente de TCR puede medirse de acuerdo con los ensayos descritos en la presente. Por ejemplo, el anticuerpo que se evaluará puede incubarse a una concentración diferente con un cultivo de linfocitos T γδ y la regulación descendente puede medirse. Si se mide la inactivación celular (por ejemplo, inactivación de células THP-1 o inactivación de células A375), los linfocitos T γδ se cocultivan con una línea celular adecuada, por ejemplo, células THP-1 o células A375. La regulación descendente de TCR puede medirse mediante citometría de flujo. La inactivación celular puede lograrse mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

Para los estudios de regulación descendente de TCR iniciales con anticuerpos parentales (por ejemplo, ADT1-7 y ADT1-4), el ensayo de regulación descendente de TCR implicó "cargar" el

anticuerpo en células THP-1 +ve receptoras de Fc gamma (ver el Ejemplo 1, el Ejemplo 6 y la Tabla 5 de WO2021/032963). Como tales, los anticuerpos en esta instancia se presentan en una superficie celular antes de la coincubación con linfocitos T γδ. Dicha carga proporciona la máxima oportunidad para aprovechar los efectos de reticulación sobre el acoplamiento de TCR. Además de la carga de anticuerpos en células +ve receptoras de Fc, enfoques alternativos similares para presentar el anticuerpo en superficies sólidas pueden incluir preincubar el anticuerpo en una placa (denominado fijado a placa) o el uso de microesferas portadoras para presentar el anticuerpo. En todos dichos ensayos, y una vez presentado en una superficie sólida, luego es habitual investigar y medir el efecto técnico conferido por el anticuerpo tras el acoplamiento del receptor diana (en esta instancia, un receptor de linfocitos T γδ). Presentar los anticuerpos de este modo es común, en particular cuando se exploran los efectos del acoplamiento de anticuerpos de dianas y complejos receptores de células inmunitarias tal como el acoplamiento de anticuerpo de dianas tales como CD3, CD28, etc.

Por otro lado, para los anticuerpos con maduración de afinidad de la invención como se describen en la presente, se quiso diseccionar y comparar el impacto de la maduración de afinidad al máximo y, por consiguiente, se investigaron las capacidades de estos anticuerpos en formatos de ensayo de regulación descendente de TCR más "solubles". La evaluación del efecto en solución también puede ser más relevante fisiológicamente. Por estas razones, y a menos que se indique de otro modo, en todos los experimentos basados en células de regulación descendente de TCR en donde los efectos de los anticuerpos con maduración de afinidad, anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de estos se miden o se caracterizan y se comparan con los anticuerpos parentales (por ejemplo, ver la Figura 35), se explora un formato de ensayo soluble. La diferencia de IC50 de utilizar este ensayo soluble más estricto se resume a continuación, en donde la regulación descendente de TCR de los valores de EC50 para una molécula parental de ejemplo (ADT1-4) se resume mediante ambos enfoques.

Regulación descendente de TCR: Formato de ensayo "presentado" en comparación con "soluble":

IC50 ADT1-4 (cargado en células THP-1): 0,01-0,05 ug/ml = 0,065 nM a 0,325 nM

(Ver el Ejemplo 1, el Ejemplo 6 y la Tabla 5 de WO2021/032963)

en comparación con

ADT1-4 IC50 (ensayo soluble, agregado en solución) = 38,28 nM

(Ver la Figura 12)

Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM, menor de alrededor de 10 nM o menor de alrededor de 1 mM. Preferentemente, la IC50 es

menor de alrededor de 1 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-4 (por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos de la invención con una región Fab relacionada con, o derivada de, el linaje ADT1-4, por ejemplo, como resultado de la maduración de afinidad o de otro modo), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM, menor de alrededor de 10 nM o menor de alrededor de 1 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 1 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-4 (con la exclusión de ADT1-4-138), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 0,5 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, los miembros del linaje ADT1-4 ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 y/o ADT1-4-1, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 0,5 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-7 (por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos de la invención con una región Fab relacionada con, o derivada de, el linaje ADT1-7, por ejemplo, como resultado de la maduración de afinidad o de otro modo), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM, menor de alrededor de 10 nM o menor de alrededor de 1 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 1 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, los miembros del linaje ADT1-7, ADT1-7-20 o ADT1-7-3, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 5 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 10 nM.

Inactivación celular

La inactivación celular puede medirse de acuerdo con los ensayos descritos en la presente.

Por ejemplo, el anticuerpo que se evaluará puede incubarse a una concentración diferente con un cocultivo de linfocitos T γδ y células tumorales (por ejemplo, células THP-1 o células A375). La inactivación celular puede medirse mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM, menor de alrededor de 5 nM, menor de alrededor de 1 nM, menor de alrededor de 0,1 nM o menor de alrededor de 0,01 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 1 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-4 (por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos de la invención con una región Fab relacionada con, o derivada de, el linaje ADT1-4, por ejemplo, como resultado de la maduración de afinidad o de otro modo), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM, menor de alrededor de 5 nM, menor de alrededor de 1 nM, menor de alrededor de 0,1 nM o menor de alrededor de 0,01 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 1 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-7 (por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos de la invención con una región Fab relacionada con, o derivada de, el linaje ADT1-7, por ejemplo, como resultado de la maduración de afinidad o de otro modo), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 5 nM, menor de alrededor de 1 nM o menor de alrededor de 0,1 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 1 nM.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, los miembros del linaje ADT1-7, ADT1-7-20 o ADT1-7-3, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM, menor de alrededor de 5 nM, menor de alrededor de 1 nM o menor de alrededor de 0,1 nM. Preferentemente, la IC50 es menor de alrededor de 1 nM.

Por supuesto, los perfiles farmacológicos ventajosos de los anticuerpos multiespecíficos pueden combinarse de modo que los anticuerpos exhiban una K_D ventajosa y valores ventajosos de IC50 para las diversas propiedades evaluadas.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden:

- fijarse a TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 o 306) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);
- fijarse opcionalmente a TRDV1 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 308) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);
- tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM);
- tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM)

En algunas formas de realización, en particular las relacionadas con el linaje ADT1-4, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden:

- fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);
- fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);
- tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM);
- tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM)
- ;

En algunas formas de realización, por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, el linaje ADT1-4 (pero sin incluir ADT1-4-138), los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden:

- fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM);
- fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);
- tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM)
- tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM)

.

En algunas formas de realización, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos o fragmentos

de fijación al antígeno de estos relacionados con, o derivados de, los miembros del linaje ADT1-4 ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-53, ADT1-4-2, ADT1-4-86, ADT1-4-112, ADT1-4-143 y/o ADT1-4-1, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos de la invención pueden:

- fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM);
- fijarse a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 50 nM;
- tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM)
- tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM)
- .

En algunas formas de realización, en particular las relacionadas con el linaje ADT1-7, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden:

- fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM);
- tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente, menor de alrededor de 10 nM);
- tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 5 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM)

En algunas formas de realización, en particular las relacionadas con los linajes ADT1-7 ADT1-7-20 o ADT1-7-3, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden:

- fijarse a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM);
- tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 5 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM);
- tener una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM)

Propiedades farmacológicas de los anticuerpos que comprenden regiones Fab del linaje ADT1-4 o derivadas de este

Las propiedades farmacológicas de los anticuerpos con respecto a su fijación (mediante la región Fab) a TRDV1 pueden encontrarse dentro de ciertos parámetros. Por ejemplo, los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-105 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con

estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-107 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-110 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-112 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM. Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-117 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-19 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 1 nM (preferentemente menor de alrededor de 0,5 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 5 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-21 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM

(preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-31 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-139 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-4 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-143 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-53 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-173 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-2 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 1 nM (preferentemente menor de alrededor de 0,5 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 5 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-8 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-82 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-83 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-3 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-84 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM

(preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-86 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-95 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 50 nM.

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-1 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-6 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 5 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente, menor de alrededor de 0,5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-4-138 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM) y/o una K_D para TRDV1 de *Macaca fascicularis* menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente, menor de alrededor de 10

nM).

Propiedades farmacológicas de los anticuerpos que comprenden regiones Fab del linaje ADT1-7

Las propiedades farmacológicas de los anticuerpos con respecto a su fijación (mediante la región Fab) a TRDV1 pueden encontrarse dentro de ciertos parámetros. Por ejemplo, los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-10 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-15 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-17 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-18 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-19 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-20 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 5 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-22 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-23 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-42 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-3 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 5 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM).

Los anticuerpos de, o derivados de, ADT1-7-61 (por ejemplo, fragmentos de estos, variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o que tienen cierto porcentaje de identidad con estos) pueden tener una K_D para TRDV1 humana menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM). Tales anticuerpos pueden tener alternativa o adicionalmente tener una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente, menor de alrededor de 10 nM).

Otras propiedades funcionales de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención tienen un perfil funcional ventajoso. En particular, a diferencia de los anticuerpos anti-Vδ1 del estado de la técnica que se enfocan en la disminución de linfocitos T Vδ1, los anticuerpos de la presente invención son útiles para la activación de linfocitos T Vδ1. A pesar de que pueden causar regulación descendente de los TCR en linfocitos T a los que se fijan, no ocasionan disminución de linfocitos T Vδ1, sino que estimulan los linfocitos T y por lo tanto pueden ser útiles en entornos terapéuticos que podrían beneficiarse de la activación de este compartimento de linfocitos T. La activación de los linfocitos T Vδ1 es evidente a través de la regulación descendente de TCR, cambios en los marcadores de activación tales como CD25 y Ki67, y marcador de desgranulación CD107a. A su vez, la activación de los linfocitos T Vδ1 activa la liberación de citocinas inflamatorias tales como INFγ y TNFα para promover la licencia inmunitaria. Sorprendentemente, los anticuerpos que tienen adecuadamente alta afinidad para TRDV1 producen inactivación aumentada de linfocitos T Vδ1 y, a diferencia de (por ejemplo) los anticuerpos que se dirigen a CD3, la provisión de anticuerpos de alta afinidad es posible sin los efectos adversos asociados con la activación a gran escala a través de CD3. A su vez, los

anticuerpos de alta afinidad pueden inducir efectos inmunoestimuladores fuertes a través de linfocitos que infiltran tumores (TIL). Esto se puede lograr con agotamiento o inactivación mínima de las células Vδ1. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden considerarse anticuerpos agonistas.

En una forma de realización de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este que se caracteriza porque:

a) causa la regulación descendente de TCR en los linfocitos T Vδ1;

b) no exhibe CDC o ADCC; y

c) no agota los linfocitos T Vδ1.

En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico anti-Vδ1 o fragmentos de fijación al antígeno también estimulan la proliferación de linfocitos T Vδ1.

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención otorgan uno o más de

(a) efectos potenciados de regulación descendente de TCR;

(b) efectos potenciados de proliferación de linfocitos T Vδ1; y/o

(c) efectos potenciados de activación de linfocitos T Vδ1

sobre linfocitos T Vδ1 cuando dichas células se encuentran en presencia de (mezcladas, próximas o adyacentes) células EGFR+ve, tales como células cancerosas EGFR+.

Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden definirse adicionalmente como que se fijan a TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 o 306) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 10 nM, preferentemente menor de alrededor de 5 nM.

Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden definirse adicionalmente como que tienen los valores de K_D y/o IC50 ventajosos analizados anteriormente.

El agotamiento de los linfocitos T es el proceso de reducción o eliminación por muerte de los linfocitos T. Las referencias a que los anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno no agotan los linfocitos T Vδ1 se refieren a un agotamiento menor de alrededor de 30 % o menor de alrededor de 20 % (preferentemente, menor de alrededor de 10 %) de la población de linfocitos T+ Vδ1 viables cuando es incubada por uno o más de los anticuerpos multiespecíficos de la invención como se describen en la presente (por ejemplo, cuando los anticuerpos se proporcionan como un anticuerpo contra IgG1), y según lo medido mediante cualquier medio adecuado en un estudio controlado (por ejemplo, mediante metodología de citometría de flujo controlada u otros ensayos controlados establecidos, tal como se describe en la Figura 18 y en la Figura 29).

ADCC y CDC son mecanismos mediante los cuales puede producirse el agotamiento de

linfocitos T. La referencia a que los anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de la presente no causan ADCC o CDC se refiere a un agotamiento menor de alrededor de 30 % o menor de alrededor de 20 % (preferentemente, menor de alrededor de 10 %) de la población de linfocitos T+ Vδ1 viables mediante ADCC y/o CDC cuando es incubada por uno o más de los anticuerpos multiespecíficos de la invención como se describen en la presente (por ejemplo, cuando los anticuerpos se proporcionan como un anticuerpo contra IgG1), según lo medido mediante cualquier medio adecuado (por ejemplo, mediante metodología de citometría de flujo controlada u otros ensayos controlados establecidos, tal como se describe en la Figura 18).

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este que se caracteriza por que no induce la secreción de IL-17A. IL-17A (interleucina-17A) es una citocina protumorigénica producida por los linfocitos T activados. IL-17A puede potenciar el crecimiento tumoral y disminuir la respuesta inmunitaria antineoplásica. Como se muestra en la **Figura 40**, los anticuerpos anti-vδ1 no inducen la secreción de IL-17A cuando se agregan a una población de células que comprende linfocitos humanos que incluyen células Vδ1+ve, mientras que los anticuerpos anti-CD3 comparativos (tales como OKT 3) sí inducen IL17A en tales circunstancias. Por consiguiente, la referencia a que los anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de la presente no inducen la secreción de IL-17A se refiere a una inducción menor de alrededor de 30 %, menor de alrededor de 20 % o menor de alrededor de 10 % de la secreción de IL-17A inducida por los anticuerpos anti-CD3 comparativos en tales circunstancias (como lo tipifica OKT 3; el comparador anti-CD3 utilizado en las Figuras 63 G a I).

Modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos y fragmentos de estos se pueden modificar de otras maneras mediante el uso de métodos conocidos. Las personas del oficio de nivel medio pueden incorporar fácilmente modificaciones de secuencia en las moléculas de anticuerpos descritas en la presente. Los siguientes ejemplos no son limitativos.

Durante el descubrimiento de anticuerpos y la recuperación de secuencias de colecciones de fagos, los dominios variables de anticuerpos deseados pueden reformatearse en IgG de longitud completa mediante subclonación. Para acelerar el proceso, los dominios variables a menudo se transfieren mediante el uso de enzimas de restricción. Estos sitios de restricción únicos pueden introducir aminoácidos adicionales/alternativos y alejarse de la secuencia canónica (tales secuencias canónicas pueden encontrarse, por ejemplo, en el sistema de información internacional ImMunoGeneTics [IMGT]; ver http://www.imgt.org). Estos pueden introducirse como modificaciones de secuencia de cadena liviana kappa o lambda.

Modificaciones de cadena liviana

Las secuencias variables de cadena liviana variable se pueden clonar mediante el uso de

sitios de restricción (por ejemplo, Nhe1-Not1) durante el reformateo en IgG de longitud completa. Más específicamente, en el terminal N de la cadena liviana, se introdujo una secuencia Ala-Ser adicional en los anticuerpos parentales (sin maduración de afinidad) para sustentar la clonación. Preferentemente, esta secuencia de AS adicional luego se elimina durante el desarrollo adicional tal como para generar la secuencia de terminal N canónica. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la cadena liviana que contiene anticuerpos descritos en la presente no contiene una secuencia de AS en su terminal N, es decir, SEQ ID NO: 26, 118, 282 a 290 o 313 no comprende la secuencia AS inicial. Los terminales N de las secuencias de cadena liviana de los anticuerpos con maduración de afinidad no comprenden ya este motivo AS.

Se pueden realizar cambios adicionales de aminoácidos para sustentar la clonación. Por ejemplo, para los anticuerpos parentales descritos en la presente que tienen cadenas livianas kappa (es decir, B07, C05, E04, F07, G06, G09, B09, G10, G04 y E07), en el límite de dominio variable/dominio constante de la cadena liviana kappa, se introdujo un cambio de valina a alanina para sustentar la clonación al momento de preparar secuencias de longitud completa. Esto dio como resultado una modificación del dominio constante kappa. Específicamente, esto dio como resultado que el dominio constante comience como RTAAAPS (desde un sitio de restricción NotI). Preferentemente, tales secuencias pueden modificarse durante un desarrollo adicional para generar las regiones constantes de cadena liviana kappa canónica que comienzan con RTVAAPS. Tales modificaciones no cambian las propiedades funcionales de los anticuerpos. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la cadena liviana kappa que contiene anticuerpos descritos en la presente contiene un dominio constante que inicia con la secuencia RTV (por ejemplo, como en SEQ ID NO: 296).

Como otro ejemplo, para los anticuerpos descritos en la presente (específicamente E01 y C08), en el límite de dominio variable/dominio constante de la cadena liviana lambda, se introdujo un cambio de secuencia de lisina a alanina para sustentar la clonación. Esto dio como resultado una modificación del dominio constante lambda. Específicamente, esto dio como resultado que el dominio constante comience como GQPAAAPS (desde un sitio de restricción NotI). Preferentemente, esta secuencia puede modificarse durante un desarrollo adicional para generar la región constante liviana lambda canónica que comienza con GQPKAAPS. Por lo tanto, en algunas formas de realización, los anticuerpos que contienen la cadena liviana lambda descritos en la presente contienen un dominio constante que inicia con la secuencia GQPK.

Modificaciones de cadena pesada

Habitualmente, las secuencias de cadena pesada variable humana inician con la glutamina básica (Q) o el glutamato ácido (E). Sin embargo, se sabe que estas dos secuencias luego se convierten en el residuo de aminoácido ácido, piroglutamato (pE). La conversión de Q en pE da

como resultado un cambio de carga en el anticuerpo, mientras que una conversión de E en pE no cambia la carga del anticuerpo. Por lo tanto, para evitar un cambio de carga variable a lo largo del tiempo, una opción es modificar una secuencia de cadena pesada de inicio de Q a E en primera instancia. Por lo tanto, en una forma de realización, la cadena pesada de anticuerpo descrito en la presente que tiene un residuo Q en el terminal N de la cadena pesada puede contener una modificación de Q a E en el terminal N. En particular, el residuo inicial de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 106, 276 a 279 o 312 puede modificarse de Q a E. Se entenderá que esta forma de realización también aplica para cualquier forma de realización que incorpore estas secuencias, por ejemplo, en anticuerpos multiespecíficos de longitud completa o fragmentos de fijación al antígeno de estos. En algunas formas de realización, puede ser ventajoso sustituir un residuo E en el terminal N de la cadena pesada por un residuo E. En consecuencia, en algunas formas de realización, el residuo E en el terminal N de cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 25, 107 a 117, 273 a 275, 280 o 281 puede sustituirse con un residuo Q.

Además, el terminal C del dominio constante de IgG1 finaliza con PGK. Sin embargo, la lisina básica (K, posición EU 447) terminal a menudo se escinde luego durante la expresión (por ejemplo, en células CHO). Esto a su vez da como resultado un cambio de carga en el anticuerpo mediante la pérdida variada del residuo de lisina del terminal C. Por lo tanto, una opción es eliminar la lisina en la primera instancia, lo que da como resultado en una secuencia del terminal C de cadena pesada uniforme y consistente que finaliza en PG. Una opción alternativa es también eliminar la G terminal (posición EU 446). Por lo tanto, en una forma de realización, en la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente, la K terminal, o la GK terminal, está eliminada de su terminal C.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este contiene una función efectora modificada a través de la alteración de los azúcares ligados a Asn 297 (esquema de numeración EU). En dicha modificación adicional, Asn 297 no está fucosilado o exhibe fucosilación reducida (es decir, un anticuerpo defucosilado o un anticuerpo no fucosilado). La fucosilación incluye la adición del azúcar fucosa a una molécula, por ejemplo, la unión de fucosa a N-glicanos, O-glicanos y glicolípidos. En consecuencia, en un anticuerpo defucosilado, la fucosa no está unida a las cadenas de carbohidratos de la región constante. El anticuerpo puede estar modificado para prevenir o inhibir la fucosilación del anticuerpo. Por lo general, las modificaciones de glicosilación implican expresar dicho anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este en una célula huésped que contiene capacidades alternativas de procesamiento de glicosilación ya sea a través de diseño por ingeniería genética o selección de huéspedes o clones dirigida o fortuita (por ejemplo, ver el Ejemplo 13). Estas y otras modificaciones efectoras se analizan adicionalmente en reseñas recientes, tales como la de Xinhua Wang *et al*. (2018) Protein

& Cell 9: 63-73 y Pereira *et al*. (2018) mAbs 10(5): 693-711, que se incorporan en la presente.

Modificaciones de alotipo opcionales

En el descubrimiento de anticuerpos, se pueden emplear alotipos humanos específicos. Opcionalmente, los anticuerpos se pueden cambiar a alotipos humanos distintos durante el desarrollo. A modo de ejemplo no limitativo, para la cadena kappa existen tres alotipos humanos denominados Km1, Km1,2 y Km3 que definen tres alelos Km (mediante numeración de alotipo): Km1 se correlaciona con valina 153 (IMGT V45.1) y leucina 191 (IMGT L101); Km1,2 se correlaciona con alanina 153 (IMGT A45.1) y leucina 191 (IMGT L101); y Km3 se correlaciona con alanina 153 (IMGT A45.1) y valina 191 (IMGT V101). Por lo tanto, se puede modificar opcionalmente una secuencia de un alotipo a otro mediante enfoques de clonación estándar. Por ejemplo, un cambio de L191V (IMGT L101V) convertirá un alotipo Km1,2 en un alotipo Km3. Para referencias adicionales acerca de dichos alotipos, ver Jefferis y Lefranc (2009) *MAbs* 1(4):332-8, que se incorpora en la presente por referencia.

Por lo tanto, en una forma de realización, un anticuerpo descrito en la presente contiene sustituciones de aminoácidos derivadas de otro alotipo humano del mismo gen. En una forma de realización adicional, el anticuerpo contiene una sustitución L191V (IMGT L101V) en la cadena kappa para convertir el dominio c de un alotipo km1,2 en un alotipo km3.

Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos de la presente invención son multiespecíficos. Pueden ser biespecíficos-multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden ser específicos para más de un polipéptido diana. Por lo tanto, en una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una primera especificidad de fijación para Vδ1 y una segunda especificidad de fijación para EGFR.

En particular, la presente invención proporciona una nueva clase de anticuerpos con alta afinidad que comprenden múltiples sitios de fijación al antígeno ("anticuerpos multiespecíficos"), incluso un sitio de fijación al antígeno para variable delta 1 (Vδ1) de TCR y un sitio de fijación al antígeno para EGFR.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención están en el formato denominado "anticuerpos $mAb^{2"}$ o "anticuerpos mAb al cuadrado", que son anticuerpos que comprenden una región Fc que se diseñó por ingeniería genética para contener bucles de fijación al antígeno en su dominio CH3. Esta región Fc modificada se denomina "Fcab". El anticuerpo mAb^2 comprende además una región Fab, que comprende un par de dominios VH-VL que proporciona un sitio de fijación al antígeno. Las moléculas mAb^2 de la presente invención comprenden una Fcab de fijación a EGFR y una Fab de fijación a vδ1.

Los TCE de la presente invención proporcionan varias ventajas en comparación con los

TCE del estado de la técnica. En particular, los TCE pueden superar muchos de los desafíos asociados con los TCE del estado de la técnica al dirigir el complejo de receptor de linfocitos T mediante un mecanismo completamente novedoso y diferente. En efecto, al dirigir (y activar) específicamente el complejo de receptor de linfocitos T solamente a través de la fijación a un epítopo en el dominio de TRDV1, se logran varias ventajas, que incluyen:

- acoplar solo un subconjunto de linfocitos T en lugar de *todos* los linfocitos T (por ejemplo, el acoplamiento de T-reg en un entorno de cáncer puede no ser conveniente);
- acoplar solo un subconjunto de linfocitos T (linfocitos T TRDV1+) que "residen en el tejido" predominantemente y cuya presencia se correlaciona a menudo positivamente con un buen pronóstico en un entorno de cáncer/tumor;
- activar el complejo de receptor de linfocitos T mediante el acoplamiento de TRDV1, lo que permite mayor opcionalidad (por ejemplo, aumentar la afinidad de este dominio de fijación, como en los anticuerpos de la presente invención). Por ejemplo, al desarrollar TCE recombinantes que se acoplan a un complejo de receptor de linfocitos T solamente a través del dominio de TRDV1 en lugar de a través de CD3, una mayor afinidad puede impulsar una funcionalidad más favorable. Por ejemplo, los TCE que se fijan a TRDV1 con alta afinidad pueden activar, pero no agotar los linfocitos T; y/o
- acoplar el complejo de TCE mediante dichos medios novedosos y a través de dominios de fijación a TRDV1 recombinantes puede dar como resultado efectos menos perjudiciales y reducir así la necesidad de atenuar la funcionalidad de Fc en dichas porciones de TCE. Se esperaría generalmente que un TCE con una función de Fc no atenuada induciría un efecto de citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC) y agotaría así la población de linfocitos T γδ reconocidos por el anticuerpo. Sin embargo, y nuevamente, al atenuar tal funcionalidad para evitar las complejidades de toxicidad/seguridad, también se puede atenuar ángulos de eficacia potencialmente importantes, por ejemplo, al acoplar células inmunitarias CD16+ o CD32+ o CD64+, o al reducir la semivida del biespecífico (por ejemplo, si se emplean fragmentos más pequeños de anticuerpo biespecífico, tales como BITE). Se esperaría que los métodos para reducir la interacción del FcγR y el TCE (tal como el uso de un formato IgG diseñado para reducir dicha interacción) reduzcan la inmovilización mediada por Fc del TCE y reduzcan el agrupamiento de TCR mediante reticulación con el TCE inmovilizado. Reducir la necesidad de atenuar la funcionalidad de Fc en dichas porciones de TCE puede proporcionar una opcionalidad adicional, por ejemplo, al permitir que TCE de TRDV1 se acople a las células TRDV1+ a través de un dominio de fijación, al acoplarse a un segundo tipo celular (tal como una célula cancerosa) a través de un segundo brazo de fijación, y al acoplarse con otras células efectoras tales como células inmunitarias CD16+ o CD32+ o CD64+ a través de un dominio Fc en funcionamiento.

- Activar el TCR vδ1 sin disminuir los linfocitos T vδ1+. Por lo tanto, los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente pueden acoplar y activar el complejo CD3/TCR γδ y otorgar su regulación descendente y pérdida de la expresión superficial, sin disminución indeseada de los linfocitos T vδ1 (ver la **Figura 29**). Esto permite que los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente se utilicen como medicamentos para tratar una enfermedad o un trastorno para mejorar al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno a través de un mecanismo que implica la activación de linfocitos T vδ1+ que residen en sangre, tejido y tumor.

Por lo tanto, mediante los descubrimientos descritos en la presente, los presentes inventores generaron una clase novedosa de TCE recombinantes. Específicamente, los presentes inventores descubrieron una nueva clase de TCE que se acoplan al receptor de linfocitos T a través de un dominio de TRDV1 en lugar de otros dominios en dichos complejos de señalización del receptor de linfocitos T. Más específicamente, los presentes inventores descubrieron una nueva clase de TCE que se acoplan a este complejo a través de un epítopo activador en TRDV1 y que se pueden fijar con mayores afinidades sin conferir potencialmente algunos de los efectos perjudiciales informados anteriormente del acoplamiento del complejo de receptor de linfocitos T con alta afinidad. Además, esta nueva clase de TCE puede acoplarse de un modo que podría permitir también la funcionalidad de Fc de tipo silvestre, lo que permite también un potencial de eficacia adicional.

Los anticuerpos multiespecíficos de la invención también pueden presentar propiedades mejoradas en comparación con los anticuerpos monoespecíficos equivalentes. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos de la invención también pueden presentar propiedades mejoradas en comparación con los anticuerpos monoespecíficos que tienen los mismos dominios de fijación al antígeno que las partes componentes de los anticuerpos multiespecíficos. En algunas formas de realización, por ejemplo, el anticuerpo multiespecífico recombinante confiere una mayor citotoxicidad mediada por linfocitos T gamma delta hacia una célula enferma que expresa el segundo epítopo en comparación con la citotoxicidad conferida por una cantidad equivalente de dicho primer anticuerpo monoespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos de la invención también pueden presentar una mejor citotoxicidad hacia células enfermas mientras preservan las células sanas.

En algunas formas de realización el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo recombinante humano codificado por uno o más marcos de lectura abiertos de ácidos nucleicos recombinantes expresados a partir de una célula huésped recombinante. En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico no es un anticuerpo de roedor u otro anticuerpo no humano derivado mediante tecnologías de hibridoma con fusión de linfocitos B. En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico no comprende una secuencia de dominio constante de

IgG no humana encontrada solo en especies animales no humanas, tal como una secuencia encontrada en hibridomas derivados de roedor.

En formas de realización preferidas, los anticuerpos multiespecíficos (adecuadamente anticuerpos biespecíficos) de la invención no se fijan específicamente a (o interactúan directamente con) CD3.

Las referencias en la presente a que un antígeno está "sobre" una célula se refieren a antígenos que se expresan en la membrana de la superficie celular o que están asociados con (el lado extracelular de) la membrana de la superficie celular de tales células.

El segundo epítopo diana es EGFR. EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) es un antígeno asociado al cáncer y es un ejemplo de un receptor tirosina quinasa, en la subfamilia de ErbB. EGFR se expresa en múltiples órganos y cumple una función importante en el inicio de la señalización que dirige el comportamiento de las células epiteliales y los tumores de origen epitelial. La señalización mediada por EGFR también está implicada en el control de la proliferación, migración, supervivencia y metástasis celulares al regular diversas vías celulares. Como con otros receptores tirosina quinasa, las mutaciones que afectan la actividad de EGFR o que conducen a la regulación ascendente de EGFR están asociadas con muchos tipos de cáncer. De hecho, se observan alteraciones genéticas en EGFR en hasta 30 % de los tumores sólidos y se las asocia por lo general con un mal pronóstico. La alteración de la señalización de EGFR, al inhibir la fijación de EGF al dominio extracelular o al inhibir la actividad de la tirosina quinasa intracelular, puede limitar el crecimiento del tumor que expresa EGFR. Por lo tanto, los inhibidores de EGFR pueden ser agentes antineoplásicos. En efecto, ciertas células tumorales dependen de la señalización de EGFR y poseen por ende una "adicción a oncogenes", lo que hace que este receptor sea una diana atractiva para tratamiento. En la técnica se conocen anticuerpos monoclonales que se fijan específicamente a epítopos de EGFR. Por ejemplo, cetuximab es un anticuerpo monoclonal que se fija específicamente a un epítopo de EGFR.

Preservación de células sanas

Si bien no se comprenden por completo los mecanismos con los que los linfocitos T γδ reconocen antígenos y distinguen entre células sanas y enfermas (Ming Heng y Madalene Heng, *Antigen Recognition by γδ T-Cells.* Madame Curie Bioscience Database [Internet], Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013), el hecho de que los linfocitos T γδ pueden distinguir entre células sanas y células enfermas y exhibir una notable policitotoxicidad para las células enfermas (ver los tipos de células de ejemplo no limitativo en la Tabla 8) significa que se los puede aprovechar para proporcionar medicamentos mejorados con una ventana terapéutica mejorada. Además, al mejorar tales capacidades de linfocitos T γδ, se proporciona una oportunidad para tratar la enfermedad mientras se preservan las células sanas, al colocalizar los linfocitos T γδ con células enfermas

incluso cuando un antígeno de cáncer, antígeno inflamatorio o antígeno patógeno particular no es conocido, o también está presente en células sanas, en un paciente en particular.

Tabla 8. Células cancerosas de ejemplo inactivadas por células Vδ1+ humanas policitotóxicas

Cáncer de mama	
M-CSF7, T47D, MDA-MB-231	Mahvi *et al.* (1993) Cancer Imm. Immunother. (1993) 37:181 – 186 Dutta I *et al.* (2017). Front. Immunol. 8:776
Cáncer de pulmón	
GLC1, N592	Ferrarini *et al.* (1996) Jn of Nat. Cancer Inst., volumen 88 (7) páginas 436–441
Cáncer de páncreas	
panc89, QGP-1, PANC-1	Maeurer *et al.* (1996) JEM 183 (4) 1681-1696 Kitayama 1993 Clin Exp Imm 93 (3) 442-7
Cáncer gastrointestinal	
HT29, HCT116, Y, SKCO1, Caco2, HCT116, Lovo, DLD-1, SW480	Wu, *et al*. (2015), OncoImmunology, 4:3, e992749 Mikulak, *et al.* (2019) JCI Insight. 4(24):e125884 Groh *et al.* (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Neuroblastoma	
LAN1, KELLY	Fisher *et al.* (2014) Clin Cancer Res; 20(22); 5720–32
Melanoma	
A375	Cordova (2012) Plos ONE 7 (11) e49878
Cáncer de ovario	
OV-1063, SW626	Groh *et al.* (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Cáncer de hígado	
HepG2	Groh *et al.* (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Cáncer de cuello uterino	
HeLa	Groh *et al.* (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Cáncer de próstata	
DV145, PC-3	Groh *et al.* (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Mieloma múltiple	
ARH77, U266	Knight *et al.* (2012) Cytotherapy, 14:9, 1110-1118,

AML	
KG-1, KASUMI-1, OCl-AML3, U937, HL60, MV4 11, AML193, HEL, THP-1	Lorenzo *et al.* (2019) Canc Imm Res 7 (4)
CLL	
MEC-1	Almeida *et al.* (2016) Clin Can Res 22 (23)

A modo de ejemplo no limitativo, estudios recientes con multiespecíficos CD3xEGFR resaltan los desafíos de los enfoques actuales o convencionales. Específicamente, el uso de tales enfoques convencionales puede dar como resultado perfiles de toxicidad menos favorables. Esto se debe a que, como muchos otros antígenos asociados a tumores (TAA), el antígeno EGFR no solo se expresa en tipos de cáncer tales como cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de cabeza y cuello, sino que también se expresa en tejidos sanos tales como células epiteliales. Por lo tanto, el uso de medicamentos CD3xEGFR que acoplan y colocalizan todos los linfocitos T con células EGFR positivas puede dar como resultado ventanas de tratamiento o índices terapéuticos menos favorables. Esto se debe a que tales medicamentos acoplarán todos los linfocitos T de los cuales la gran mayoría en circulación serán linfocitos T αβ (CD4+ positivos, CD8+ positivos, etc.). Y una vez que los linfocitos T αβ se colocalizan con células EGFR positivas, tales linfocitos T αβ convencionales exhiben capacidades limitadas para preservar las células sanas EGFR+ y capacidades limitadas para inactivar solo las células enfermas EGFR+. Estos obstáculos se destacan además en estudios de toxicología de ejemplo en *Macaca fascicularis* (únicamente machos). En los estudios de Lutterbuese *et al.* 2010 (doi: 10.1073/pnas.1000976107), se utilizaron biespecíficos CD3xEGFR con formato BITE® pequeños. Dado que estas moléculas exhiben semividas/perfiles de exposición sistémica reducidos en comparación con moléculas a base de anticuerpos más grandes (que son >70 Kda), se puede anticipar que tales porciones serán bien toleradas. Sin embargo, incluso a modestas dosis "más altas" mediante infusión por i.v. continua de 31 y 154 µg/kg/día, se observaron signos graves de toxicidad dentro de las 56 h posteriores al inicio de la infusión. Esta situación condujo a la eutanasia de los animales por razones de bienestar. Los análisis histopatológicos de los animales que recibieron la dosis mostraron signos de toxicidad en los riñones e hígado, lo que puede ser un resultado de la lisis redirigida de células que expresan bajos niveles de EGFR en estos órganos. Adicionalmente, los animales en ambos grupos con altas dosis mostraron niveles aumentados de citocinas inflamatorias en suero (es decir, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-5 e IL-2), que se presume que fueron liberadas por los linfocitos T que se encontraron con células EGFR positivas. Se registraron cambios histopatológicos, incluso infiltración de linfocitos e inactivación celular, en todos los tejidos que se sabe que expresan EGFR, es decir, glándulas salivales, hígado, estómago, intestino delgado, colon, recto, riñones,

glándulas suprarrenales, uréter, vejiga urinaria, próstata y epidídimo.

Por lo tanto, en lugar de emplear tales enfoques convencionales, se proporcionan en la presente anticuerpos multiespecíficos en donde al menos un primer dominio de fijación puede fijarse específicamente a células Vδ1+ y al menos un segundo dominio de fijación es capaz de fijarse específicamente a EGFR, una diana presente en células y tejidos enfermos. El uso de tales anticuerpos multiespecíficos de esta manera puede dar como resultado la colocalización de células Vδ1+ a las células enfermas que expresan la segunda diana. Además, y dado que tales dianas asociadas a la enfermedad no son 100 % específicas de la enfermedad, este enfoque de dirigir y colocalizar células efectoras Vδ1+ específicamente puede ser de mayor preferencia en comparación con los enfoques convencionales. Esto se debe a que las células efectoras Vδ1+ pueden ser capaces de reconocer patrones de estrés en células enfermas o infectadas y por ende capaces de inactivar selectivamente las células enfermas mientras preservan las células sanas que también expresan la misma diana.

Por lo tanto, los anticuerpos multiespecíficos presentados en la presente son capaces de acoplarse en el TCR de células vδ1, pero no se produce una activación completa a menos que también haya células tumorales. Un acoplamiento completo de los anticuerpos presentados en la presente en el TCR conduce a una regulación descendente parcial y se cree que las células vδ1 fijadas a los anticuerpos presentados en la presente solo se activan por completo y se vuelven citotóxicas en presencia de células estresadas, tales como células tumorales. Esto se muestra, por ejemplo, en el Ejemplo 18 y la Figura 40). Esto representa otra ventaja de seguridad vital para el enfoque presentado en la presente, ya que la citotoxicidad fuera de la diana se reduce y toda la potencia de los anticuerpos multiespecíficos para activar las células vδ1 solo se produce en presencia de células tumorales, por lo que se preservan las células sanas (incluso las células sanas que expresan EGFR).

Se cree que un mecanismo detrás de la capacidad de los linfocitos T γδ para detectar señales de estrés en las células tumorales se debe a los NCR (receptores de citotoxicidad naturales) que expresan. Los NCR son capaces de acoplar los ligandos de NCR en las células tumorales. Por lo tanto, se puede emplear un mecanismo de activación doble, en donde los linfocitos T γδ se activan a través de la estimulación de TCR, incluso a través de NCR, que pueden detectar las células tumorales para permitir una activación completa y la citotoxicidad.

Esto se diferencia de la estimulación de linfocitos T αß a través de CD3, por ejemplo, en donde toda la estimulación es a través del TCR. Por lo tanto, tales células casi no se diferencian entre células sanas o transformadas porque no tienen mecanismos tales como la detección de células tumorales independiente de la presentación del antígeno, por ejemplo, a través de NCR. Por lo tanto, si los anticuerpos contra CD3 tienen habilitación de Fc, atraerán otras células

inmunitarias que pueden desencadenar una cascada de eventos impredecibles y deseables tales como tormentas de citocinas, agotamiento e incluso sobreactivación de células inmunitarias, lo que conduce, por ejemplo, a la inactivación de los linfocitos T por parte de las células NK, etc. En el presente enfoque, la estimulación de los linfocitos T γδ con los anticuerpos multiespecíficos presentados en la presente no conduce a tales preocupaciones porque los linfocitos T γδ) son capaces de distinguir entre células sanas y células tumorales, incluso a través de su mecanismo de detección de NCR y, por lo tanto, inactivan selectivamente las células estresadas tales como las células cancerosas o las células infectadas viralmente por esta especificidad de células enfermas.

El segundo epítopo diana puede estar en una célula diferente que incluye un linfocito T, linfocitos B, célula tumoral, célula de tejido autoinmunitario o célula infectada viralmente diferente.

Se han descrito previamente diversos formatos multiespecíficos derivados de anticuerpos y por lo general se construyen a partir de las piezas de fijación del componente. Por lo general, una vez construidos, el rendimiento de tales formatos de fijación multiespecíficos o multidiana como se describen en la presente se puede medir en uno o más de los sistemas modelo mencionados anteriormente (inactivación de células, proliferación celular, ahorro de células sanas/modelos específicos de células enfermas, etc.). Opcionalmente, también se comparan con dichas partes componentes y otras moléculas comparativas.

Si bien no están limitados por este enfoque, en general, cuando se construyen anticuerpos como anticuerpos multiespecíficos de la presente invención, los módulos de dominio de fijación a cada diana (primera y segunda) se construyen a partir de módulos de fijación a Fab y Fcab que se combinan para formar anticuerpos de longitud completa. La modificación y la generación de anticuerpos multiespecíficos y dominios de fijación a Fab y Fcab deseados se puede llevar a cabo mediante una metodología de biología molecular de rutina conocida en la técnica. A modo de ejemplo no limitativo, se pueden emplear enfoques basados en oligonucleótidos con o sin la ayuda de amplificación por PCR para construir secuencias de ADN sintético que codifican un dominio CH3 deseado y/u otros elementos del anticuerpo biespecífico deseado. Opcionalmente, luego se pueden clonar de manera correcta en un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la cadena pesada del anticuerpo inicial (como uno descrito en la presente) mediante metodologías de subclonación basadas en enzimas de restricción para reemplazar la secuencia de CH3 inicial por la secuencia de CH3 modificada deseada. De manera recíproca, se pueden emplear enfoques basados en oligonucleótidos con o sin la ayuda de amplificación por PCR para generar elementos de ADN de ORF diseñados para codificar la región VH deseada (como una descrita en la presente) y luego subclonarlos o cambiarlos a un casete de ORF de cadena pesada preexistente que ya expresa la región que codifica el dominio CH3 deseado. Alternativamente, los elementos más

grandes o incluso el ORF que codifica la cadena pesada de anticuerpo entero se puede construir *de novo* a partir de una secuencia *in silico* inicial con oligonucleótido y/o metodologías de PCR para generar el ORF final entero que codifica una cadena pesada de longitud completa preferida que comprende un brazo de fijación a VH y un dominio CH3 modificado del anticuerpo multiespecífico descrito en la presente. Esto se puede expresar, recuperar y purificar en combinación con una cadena liviana kappa cognada preferida, tal como la descrita en la presente, para generar un anticuerpo multiespecífico purificado final que fija el dominio TRDV1 de TCR Vδ1 humano y se liga operativamente a dominios de fijación CH3 modificados que se fijan a EGFR humano.

Notablemente, los anticuerpos multiespecíficos que comprenden al menos un (primer) dominio de fijación que se dirige a la cadena Vδ1 de un TCR γδ como se describe en la presente se mejoran adicionalmente cuando dicho primer dominio de fijación recibe un formato de anticuerpo multiespecífico que comprende al menos un segundo dominio de fijación contra EGFR.

Anticuerpos multiespecíficos - ejemplos no limitativos:

Para describir la aplicabilidad del enfoque se construyó una serie de anticuerpos multiespecíficos de ejemplo no limitativos. Estos anticuerpos multiespecíficos comprenden al menos un (primer) dominio de fijación que se dirige a la cadena Vδ1 de un TCR γδ y al menos un (segundo) dominio de fijación que se dirige a EGFR:

multiespecífico

Anticuerpo multiespecífico Vδ1-EGFR (LEE)

En este aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR. La región Fab comprende específicamente un dominio VH y VL cognado. La región Fc comprende un dominio de fijación dentro de un dominio constante de cadena pesada (CH1-CH2-CH3), específicamente un dominio CH3.

SEQ ID NO:	**Descripción**
389	ADT1-4-2 x LEE (LAGA)
391	Módulo de fijación a EGFR (LEE) CH1-CH2-CH3 (LAGA)
392	Módulo de fijación a EGFR (LEE) CH1-CH2-CH3 (IgG1 wt)
400	ADT1-4-2 x LEE (wt)
432	ADT1-4-2 HC (LAGA) EGFR LEE
436	ADT1-4-2 HC (wt) EGFR LEE

562	Módulo de fijación CH3 a EGFR LEE
523	Sustituciones AB de EGFR LEE residuos 359 a 362 (numeración EU)
511	Sustituciones CD de EGFR LEE residuos 384 a 386 (numeración EU)
512	Sustituciones EF de EGFR LEE residuos 413 a 419 (numeración EU)
524	Bucle AB de EGFR LEE residuos 355 a 362 (numeración EU)
514	Bucle CD de EGFR LEE residuos 383 a 391 (numeración EU)
515	Bucle EF de EGFR LEE residuos 413 a 422 (numeración EU)
563	IgG1 wt CH3 (residuos 341 a 446 (numeración EU))

En este aspecto, el sitio de fijación a EGFR se puede proporcionar mediante un dominio CH3 IgG1, en donde los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP (SEQ ID NO: 523), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK (SEQ ID NO: 512).

En este aspecto, los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

En este aspecto, el dominio CH3 de IgG1 puede comprender las siguientes mutaciones (numeración EU). En el bucle AB pueden estar presentes las siguientes mutaciones: T359E.K360E.N361G.Q362P. En el bucle CD pueden estar presentes las siguientes mutaciones: N384T.G385Y.Q386G. En el bucle EF pueden estar presentes las siguientes mutaciones: D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K.

En este aspecto, la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 puede ser al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 562.

En este aspecto, el dominio constante de cadena pesada puede comprender SEQ ID NO: 391 o SEQ ID NO: 392.

En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 389; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 432. En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 400; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 436.

En este aspecto, la región Fab puede ser cualquiera de las regiones Fab descritas en la presente (ver la Tabla 9, por ejemplo). Específicamente, la región Fab de este aspecto puede comprender una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente. La región Fab de este aspecto puede comprender una VH que comprende SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende SEQ ID NO: 40.

En una forma de realización de este aspecto, el anticuerpo multiespecífico comprende una región Fab que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región Fc que comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 562. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden comprender un residuo de lisina (K) adicional en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 (K447, numeración EU). En algunas formas de realización, en los anticuerpos multiespecíficos de la invención, el residuo de glicina (G) terminal en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 puede estar eliminado (G446, numeración EU).

Tabla 9. LEE - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab							**Región Fc**		
	VH			**VL**			**El bucle AB comprende**	**El bucle CD comprende**	**El bucle EF comprende**
Derivado de anticuerpo	**CDR 1**	**CDR 2**	**CDR 3**	**CDR 1**	**CDR 2**	**CDR 3**			
ADT1-4 parental	51	53	54	79	80	81	Los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP SEQ ID NO: 523	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			

ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
ADT1-7 parental	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

La presente divulgación incluye explícitamente un anticuerpo que tiene las secuencias de cada fila de la tabla anterior. Por ejemplo, la presente divulgación incluye un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ, en donde la región Fab comprende una VHCDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 51, una VHCDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53, una VHCDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 68, una VLCDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 79, una VLCDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 80 y una

VLCDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 95; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR, en donde el sitio de fijación a EGFR se proporciona mediante un dominio CH3 en donde los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden SEQ ID NO: 523, los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden SEQ ID NO: 511 y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SEQ ID NO: 512. Cada fila de la tabla anterior se divulga de la misma manera. Dichos anticuerpos son anticuerpos IgG1 humanos. Por lo tanto, los anticuerpos IgG1 humanos pueden comprender un dominio CH3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 562.

Tabla 10. LEE - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las regiones variables de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab			**Región Fc**		
Derivado de anticuerpo	**VH**	**VL**	**El bucle AB comprende**	**El bucle CD comprende**	**El bucle EF comprende**
ADT1-4 parental	1	26			
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33	Los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP SEQ ID NO: 523	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			

ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
ADT1-7 parental	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

La presente divulgación incluye explícitamente un anticuerpo que tiene las secuencias de cada fila de la tabla anterior. Por ejemplo, la presente divulgación incluye un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ, en donde la región Fab comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40; y la

región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR, en donde el sitio de fijación a EGFR se proporciona mediante un dominio CH3 en donde los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden SEQ ID NO: 523, los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden SEQ ID NO: 511 y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SEQ ID NO: 512. Cada fila de la tabla anterior se divulga de la misma manera. Dichos anticuerpos son anticuerpos IgG1 humanos. Por lo tanto, los anticuerpos IgG1 humanos pueden comprender un dominio CH3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 562.

Anticuerpo multiespecífico Vδ1-EGFR (LEE1)

En este aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR. La región Fab comprende específicamente un dominio VH y VL cognado. La región Fc comprende un dominio de fijación dentro de un dominio constante de cadena pesada (CH1-CH2-CH3), específicamente, un dominio CH3.

SEQ ID NO:	**Descripción**
504	ADT1-4-2 x LEE1 (LAGA)
505	ADT1-4-2 x LEE1 (wt)
506	ADT1-4-2 HC EGFR LEE1 (LAGA)
507	ADT1-4-2 HC EGFR LEE1 (wt)
508	Módulo de fijación a EGFR LEE1 CH1-CH2-CH3 (LAGA)
509	Módulo de fijación a EGFR LEE1 CH1-CH2-CH3 (wt)
510	Módulo de fijación CH3 a EGFR LEE1
511	Sustituciones CD de EGFR LEE1 residuos 384 a 386 (numeración EU)
512	Sustituciones EF de EGFR LEE1 residuos 413 a 419 (numeración EU)
513	Bucle AB de EGFR LEE1 (WT) residuos 355 a 362 (numeración EU)
514	Bucle CD de EGFR LEE1 residuos 383 a 391 (numeración EU)
515	Bucle EF de EGFR LEE1 residuos 413 a 422 (numeración EU)

En este aspecto, el sitio de fijación a EGFR se puede proporcionar mediante un dominio CH3 IgG1, en donde los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK (SEQ ID NO: 512).

En este aspecto, los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELTKNQ (SEQ ID NO: 513), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

En este aspecto, el dominio CH3 de IgG1 puede comprender las siguientes mutaciones (numeración EU). El bucle AB puede ser de tipo silvestre (sin mutaciones). En el bucle CD pueden estar presentes las siguientes mutaciones: N384T.G385Y.Q386G. En el bucle EF pueden estar presentes las siguientes mutaciones: D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K.

En este aspecto, la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 puede ser al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 510.

En este aspecto, el dominio constante de cadena pesada puede comprender SEQ ID NO: 508 o SEQ ID NO: 509.

En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 504 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 506. En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 505 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 507.

En este aspecto, la región Fab puede ser cualquiera de las regiones Fab descritas en la presente (ver la Tabla 11, por ejemplo). Específicamente, la región Fab de este aspecto puede comprender una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente. La región Fab de este aspecto puede comprender una VH que comprende SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende SEQ ID NO: 40.

En una forma de realización de este aspecto, el anticuerpo multiespecífico comprende una región Fab que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región Fc que comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 510. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden comprender un residuo de lisina (K) adicional en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 (K447, numeración EU). En algunas formas de realización, en los anticuerpos multiespecíficos de la invención, el residuo de glicina (G) terminal en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 puede estar eliminado (G446, numeración EU).

Tabla 11. LEE1 - *anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que*

tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab					**Región Fc**				
	VH			**VL**					
Derivado de anticuerpo	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	51	53	54	79	80	81	Los residuos 355 a 362 (numeración EU) comprenden RDELTKNQ SEQ ID NO: 513	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
ADT1-7 parental	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			

ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Tabla 12. LEE1 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab			**Región Fc**		
Derivado de anticuerpo	**VH**	**VL**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	1	26	Los residuos 355 a 362 (numeración EU) comprenden RDELTKNQ SEQ ID NO: 513	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			

ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
ADT1-7 parental	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Anticuerpo multiespecífico Vδ1-EGFR (LEE2)

En este aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR. La región Fab comprende específicamente un dominio VH y VL cognado. La región Fc comprende un dominio de fijación dentro de un dominio constante de cadena pesada (CH1-CH2-CH3), específicamente, un dominio

CH3.

SEQ ID NO:	Descripción
516	ADT1-4-2 x LEE2 (LAGA)
517	ADT1-4-2 x LEE2 (wt)
518	ADT1-4-2 HC EGFR LEE2 (LAGA)
519	ADT1-4-2 HC EGFR LEE2 (wt)
520	Módulo de fijación a EGFR LEE2 CH1-CH2-CH3 (LAGA)
521	Módulo de fijación a EGFR LEE2 CH1-CH2-CH3 (wt)
522	Módulo de fijación CH3 a EGFR LEE2
523	Sustituciones AB de EGFR LEE2 residuos 359 a 362 (numeración EU)
512	Sustituciones EF de EGFR LEE2 residuos 413 a 419 (numeración EU)
524	Bucle AB de EGFR LEE2 residuos 355 a 362 (numeración EU)
525	Bucle CD de EGFR LEE2 (WT) residuos 383 a 391 (numeración EU)
515	Bucle EF de EGFR LEE2 residuos 413 a 422 (numeración EU)

En este aspecto, el sitio de fijación a EGFR se puede proporcionar mediante un dominio CH3 IgG1, en donde los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP (SEQ ID NO: 523) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK (SEQ ID NO: 512).

En este aspecto, los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende SNGQPENNYKT (SEQ ID NO: 525) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

En este aspecto, el dominio CH3 de IgG1 puede comprender las siguientes mutaciones (numeración EU). En el bucle AB pueden estar presentes las siguientes mutaciones: T359E.K360E.N361G.Q362P. El bucle CD puede ser de tipo silvestre (sin mutaciones). En el bucle EF pueden estar presentes las siguientes mutaciones: D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K.

En este aspecto, la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 puede ser al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 522.

En este aspecto, el dominio constante de cadena pesada puede comprender SEQ ID NO:

520 o SEQ ID NO: 521. En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 516 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 518. En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 517 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 519.

En este aspecto, la región Fab puede ser cualquiera de las regiones Fab descritas en la presente (ver la Tabla 13, por ejemplo). Específicamente, la región Fab de este aspecto puede comprender una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente. La región Fab de este aspecto puede comprender una VH que comprende SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende SEQ ID NO: 40.

En una forma de realización de este aspecto, el anticuerpo multiespecífico comprende una región Fab que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región Fc que comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 522. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden comprender un residuo de lisina (K) adicional en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 (K447, numeración EU). En algunas formas de realización, en los anticuerpos multiespecíficos de la invención, el residuo de glicina (G) terminal en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 puede estar eliminado (G446, numeración EU).

Tabla 13. LEE2 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab							**Región Fc**		
	VH			**VL**					
Derivado de anticuerpo	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	51	53	54	79	80	81	Los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP SEQ ID	Los residuos 383 a 391 de tipo silvestre (numeración EU) forman un bucle CD y comprenden SNGQPENNY	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			

ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90	NO: 523	KT SEQ ID NO: 525	
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
ADT1-7 parental	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Tabla 14. LEE2 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las regiones variables de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab			**Región Fc**		
Derivado de anticuerpo	**VH**	**VL**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**

ADT1-4 parental	1	26	Los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP SEQ ID NO: 523	Los residuos 383 a 391 de tipo silvestre (numeración EU) forman un bucle CD y comprenden SNGQPENNYKT SEQ ID NO: 525	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
ADT1-7 parental	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			

ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Anticuerpo multiespecífico Vδ1-EGFR (LEE3)

En este aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR. La región Fab comprende específicamente un dominio VH y VL cognado. La región Fc comprende un dominio de fijación dentro de un dominio constante de cadena pesada (CH1-CH2-CH3), específicamente, un dominio CH3.

SEQ ID NO:	**Descripción**
526	ADT1-4-2 x LEE3 (LAGA)
527	ADT1-4-2 x LEE3 (wt)
528	ADT1-4-2 HC EGFR LEE3 (LAGA)
529	ADT1-4-2 HC EGFR LEE3 (wt)
530	Módulo de fijación a EGFR LEE3 CH1-CH2-CH3 (LAGA)
531	Módulo de fijación a EGFR LEE3 CH1-CH2-CH3 (wt)
532	Módulo de fijación CH3 a EGFR LEE3
523	Sustituciones AB de EGFR LEE3 residuos 359 a 362 (numeración EU)
511	Sustituciones CD de EGFR LEE3 residuos 384 a 386 (numeración EU)
533	Sustituciones EF de EGFR LEE3

	residuos 413 a 415 (numeración EU)
524	Bucle AB de EGFR LEE3 residuos 355 a 362 (numeración EU)
514	Bucle CD de EGFR LEE3 residuos 383 a 391 (numeración EU)
534	Bucle EF de EGFR LEE3 residuos 413 a 422 (numeración EU)

En este aspecto, el sitio de fijación a EGFR se puede proporcionar mediante un dominio CH3 IgG1, en donde los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP (SEQ ID NO: 523), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 415 (numeración EU) comprenden SYW (SEQ ID NO: 533).

En este aspecto, los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

En este aspecto, el dominio CH3 de IgG1 puede comprender las siguientes mutaciones (numeración EU). En el bucle AB pueden estar presentes las siguientes mutaciones: T359E.K360E.N361G.Q362P. En el bucle CD pueden estar presentes las siguientes mutaciones: N384T.G385Y.Q386G. En el bucle EF pueden estar presentes las siguientes mutaciones: D413S.K414Y.S415W.

En este aspecto, la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 puede ser al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 532.

En este aspecto, el dominio constante de cadena pesada puede comprender SEQ ID NO: 530 o SEQ ID NO: 531.

En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 526 o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 528. En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 527 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 529.

En este aspecto, la región Fab puede ser cualquiera de las regiones Fab descritas en la presente (ver la Tabla 15, por ejemplo). Específicamente, la región Fab de este aspecto puede comprender una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente. La región Fab de este aspecto puede comprender una VH que comprende SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende SEQ ID NO: 40.

En una forma de realización de este aspecto, el anticuerpo multiespecífico comprende una región Fab que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región Fc que comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 532. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden comprender un residuo de lisina (K) adicional en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 (K447, numeración EU). En algunas formas de realización, en los anticuerpos multiespecíficos de la invención, el residuo de glicina (G) terminal en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 puede estar eliminado (G446, numeración EU).

Tabla 15. LEE3 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab							**Región Fc**		
	VH			**VL**					
Derivado de anticuerpo	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	51	53	54	79	80	81	Los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP SEQ ID NO: 523	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Residuos 413 a 415 (numeración EU) comprenden SYW SEQ ID NO: 533
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			

ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
ADT1-7 parental	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Tabla 16. LEE3 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las regiones variables de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab			**Región Fc**		
Derivado de anticuerpo	**VH**	**VL**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	1	26	Los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP SEQ ID NO: 523	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 415 (numeración EU) comprenden SYW SEQ ID NO: 533
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			

ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
ADT1-7 parental	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Anticuerpo multiespecífico Vδ1-EGFR (FS1-67)

En este aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que

comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR. La región Fab comprende específicamente un dominio VH y VL cognado. La región Fc comprende un dominio de fijación dentro de un dominio constante de cadena pesada (CH1-CH2-CH3), específicamente, un dominio CH3.

SEQ ID NO:	**Descripción**
377	Anti-lisozima de pollo x FS1-67 (dominio de fijación a EGFR)
378	C08 parental x FS1-67 (LAGA)
379	G04 parental x FS1-67 (LAGA)
380	E07 parental x FS1-67 (LAGA)
385	Módulo de fijación a EGFR (FS-167) CH1-CH2-CH3 (IgG1 wt)
386	Módulo de fijación a EGFR (FS-167) CH1-CH2-CH3 (LAGA)
388	ADT1-4-2 x FS1-67 EGFR (LAGA)
399	ADT1-4-2 x FS1-67 EGFR (wt)
426	C08 HC (LAGA) EGFR FS1-67
427	E07 HC (LAGA) EGFR FS1-67
431	ADT1-4-2 HC (LAGA) EGFR FS1-67
435	ADT1-4-2 HC (wt) EGFR FS1-67
437	G04 HC (LAGA) EGFR FS1-67
559	Módulo de fijación CH3 a EGFR FS1-67
560	Sustituciones AB de EGFR FS1-67 residuos 358 a 362 (numeración EU)
511	Sustituciones CD de EGFR FS1-67 residuos 384 a 386 (numeración EU)
512	Sustituciones EF de EGFR FS1-67 residuos 413 a 419 (numeración EU)
561	Bucle AB de EGFR FS1-67 residuos 355 a 362 (numeración EU)
514	Bucle CD de EGFR FS1-67 residuos 383 a 391 (numeración EU)

515	Bucle EF de EGFR FS1-67 residuos 413 a 422 (numeración EU)

En este aspecto, el sitio de fijación a EGFR se puede proporcionar mediante un dominio CH3 IgG1, en donde los residuos 358 a 362 (numeración EU) comprenden TDDGP (SEQ ID NO: 560), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK (SEQ ID NO: 512).

En este aspecto, los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDETDDGP (SEQ ID NO: 561), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515).

En este aspecto, el dominio CH3 de IgG1 puede comprender las siguientes mutaciones (numeración EU). En el bucle AB pueden estar presentes las siguientes mutaciones: L358T.T359D.K360D.N361G.Q362P. En el bucle CD pueden estar presentes las siguientes mutaciones: N384T.G385Y.Q386G. En el bucle EF pueden estar presentes las siguientes mutaciones: D413S.K414Y.S415W.Q418Y.Q419K.

En este aspecto, la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 puede ser al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 559.

En este aspecto, el dominio constante de cadena pesada puede comprender SEQ ID NO: 385 o SEQ ID NO: 386.

En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 388; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 431. En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 399; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 435.

En este aspecto, la región Fab puede ser cualquiera de las regiones Fab descritas en la presente (ver la Tabla 17, por ejemplo). Específicamente, la región Fab de este aspecto puede comprender una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente. La región Fab de este aspecto puede comprender una VH que comprende SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende SEQ ID NO: 40.

En una forma de realización de este aspecto, el anticuerpo multiespecífico comprende una región Fab que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región Fc que comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 559. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención

pueden comprender un residuo de lisina (K) adicional en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 (K447, numeración EU). En algunas formas de realización, en los anticuerpos multiespecíficos de la invención, el residuo de glicina (G) terminal en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 puede estar eliminado (G446, numeración EU).

En una forma de realización, el anticuerpo multiespecífico de la invención no es ADT1-4xFS1-67.

Tabla 17. FS1-67 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab							**Región Fc**		
	VH			**VL**					
Derivado de anticuerpo	**CDR 1**	**CDR 2**	**CDR3**	**CDR 1**	**CDR 2**	**CDR3**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	51	53	54	79	80	81	Los residuos 358 a 362 (numeración EU) comprenden TDDGP SEQ ID NO: 560	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			

ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
ADT1-7 parental	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Tabla 18. FS1-67 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las regiones variables de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab			**Región Fc**		
Derivado de anticuerpo	**VH**	**VL**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	1	26	Los residuos 358 a 362 (numeración EU) comprenden TDDGP SEQ ID NO: 560	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK SEQ ID NO: 512
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			

ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
ADT1-7 parental	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			

G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Anticuerpo multiespecífico Vδ1-EGFR (FS1-65)

En este aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR. La región Fab comprende específicamente un dominio VH y VL cognado. La región Fc comprende un dominio de fijación dentro de un dominio constante de cadena pesada (CH1-CH2-CH3), específicamente, un dominio CH3.

SEQ ID NO:	**Descripción**
535	ADT1-4-2 x FS1-65 (LAGA)
536	ADT1-4-2 x FS1-65 (wt)
537	ADT1-4-2 HC EGFR FS1-65 (LAGA)
538	ADT1-4-2 HC EGFR FS1-65 (wt)
539	Módulo de fijación a EGFR FS1-65 CH1-CH2-CH3 (LAGA)
540	Módulo de fijación a EGFR FS1-65 CH1-CH2-CH3 (wt)
541	Módulo de fijación CH3 a EGFR FS1-65
542	Sustituciones AB de EGFR FS1-65 residuos 358 a 362 **(INCLUSO 361.1)** (numeración EU)
511	Sustituciones CD de EGFR FS1-65 residuos 384 a 386 (numeración EU)
543	Sustituciones EF de EGFR FS1-65 residuos 413 a 419 (numeración EU)
544	Bucle AB de EGFR FS1-65 residuos 355 a 362 (incluso 361.1) (numeración EU)
514	Bucle CD de EGFR FS1-65 residuos 383 a 391 (numeración EU)
545	Bucle EF de EGFR FS1-65 residuos 413 a 422 (numeración EU)

En este aspecto, el sitio de fijación a EGFR se puede proporcionar mediante un dominio CH3 IgG1, en donde los residuos 358 a 361, 361.1 y 362 (numeración EU) comprenden LDEEGP (SEQ ID NO: 542), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWVK (SEQ ID NO: 543). En donde el residuo 361.1 indica un residuo adicional entre los residuos 361 y 362 (numeración EU).

En este aspecto, los residuos 355 a 362, que incluyen el residuo 361.1 (numeración EU), forman un bucle AB que comprende RDELDEGGP (SEQ ID NO: 544), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWVKGNV (SEQ ID NO: 545). En donde el residuo 361.1 indica un residuo adicional entre el residuo 361 y 362 (numeración EU).

En este aspecto, el dominio CH3 de IgG1 puede comprender las siguientes mutaciones (numeración EU). En el bucle AB pueden estar presentes las siguientes mutaciones: T359D.K360E.N361G.361-1G.Q362P. En el bucle CD pueden estar presentes las siguientes mutaciones: N384K.G385F.Q386G. En el bucle EF pueden estar presentes las siguientes mutaciones: D413S.K414Y.S415W.Q418V.Q419K. En donde el residuo 361-1 indica un residuo adicional entre los residuos 361 y 362 (numeración EU).

En este aspecto, la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 puede ser al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 541.

En este aspecto, el dominio constante de cadena pesada puede comprender SEQ ID NO: 539 o SEQ ID NO: 540.

En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 535 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 537. En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 536 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 538.

En este aspecto, la región Fab puede ser cualquiera de las regiones Fab descritas en la presente (ver la Tabla 19, por ejemplo). Específicamente, la región Fab de este aspecto puede comprender una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente. La región Fab de este aspecto puede comprender una VH que comprende SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende SEQ ID NO: 40.

En una forma de realización de este aspecto, el anticuerpo multiespecífico comprende una región Fab que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una

región Fc que comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 541. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden comprender un residuo de lisina (K) adicional en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 (K447, numeración EU). En algunas formas de realización, en los anticuerpos multiespecíficos de la invención, el residuo de glicina (G) terminal en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 puede estar eliminado (G446, numeración EU).

Tabla 19. FS1-65 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab							**Región Fc**		
	VH			**VL**					
Derivado de anticuerpo	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	51	53	54	79	80	81	Los residuos 358 a 361, 361.1 y 362 (numeración EU) comprenden LDEEGP SEQ ID NO: 542	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWVK SEQ ID NO: 543
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			

ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
ADT1-7 parental	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			
ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Tabla 20. FS1-65 - anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las regiones variables de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab			**Región Fc**		
Derivado de anticuerpo	**VH**	**VL**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	1	26	Los residuos 358 a 361, 361.1 y 362 (numeración EU) comprenden LDEEGP SEQ ID NO: 542	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG SEQ ID NO: 511	Los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWVK SEQ ID NO: 543
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			

ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
ADT1-7 parental	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			
ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Anticuerpo multiespecífico Vδ1-EGFR (747)

En este aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación

específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR. La región Fab comprende específicamente un dominio VH y VL cognado. La región Fc comprende un dominio de fijación dentro de un dominio constante de cadena pesada (CH1-CH2-CH3), específicamente, un dominio CH3.

SEQ ID NO:	**Descripción**
546	ADT1-4-2 x 747 (LAGA)
547	ADT1-4-2 x 747 (wt)
548	ADT1-4-2 HC EGFR 747 (LAGA)
549	ADT1-4-2 HC EGFR 747 (wt)
550	Módulo de fijación a EGFR 747 CH1-CH2-CH3 (LAGA)
551	Módulo de fijación a EGFR 747 CH1-CH2-CH3 (wt)
552	Módulo de fijación CH3 747 - más mutación de marco A378V adicional
553	Sustituciones AB de EGFR 747 residuos 358 a 362 (numeración EU)
554	Sustituciones CD de EGFR 747 residuos 384 a 386 (numeración EU)
555	Sustituciones EF de EGFR 747 residuos 413 a 421 (numeración EU)
556	Bucle AB de EGFR 747 residuos 355 a 362 (numeración EU)
557	Bucle CD de EGFR 747 residuos 383 a 391 (numeración EU)
558	Bucle EF de EGFR 747 residuos 413 a 422 (numeración EU)

En este aspecto, el sitio de fijación a EGFR se puede proporcionar mediante un dominio CH3 IgG1, en donde los residuos 358 a 362 (numeración EU) comprenden TESGP (SEQ ID NO: 553), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden KFG (SEQ ID NO: 554) y los residuos 413 a 421 (numeración EU) comprenden SNLRWTKGH (SEQ ID NO: 555) y el residuo 378 es valina.

En este aspecto, los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDETESGP (SEQ ID NO: 556), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende SKFGPENNYKT (SEQ ID NO: 557), los residuos 413 a 422 (numeración

EU) forman un bucle EF que comprende SNLRWTKGHV (SEQ ID NO: 558); y el residuo 378 es valina.

En este aspecto, el dominio CH3 de IgG1 puede comprender las siguientes mutaciones (numeración EU). En el bucle AB pueden estar presentes las siguientes mutaciones: L358T.T359E.K360S.N361G.Q362P. En el bucle CD pueden estar presentes las siguientes mutaciones: N384K.G385F.Q386G. En el bucle EF pueden estar presentes las siguientes mutaciones: D413S.K414N.S415L.Q418T.Q419K.N421H. La siguiente mutación también está presente: A378V.

En este aspecto, la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 puede ser al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 552.

En este aspecto, el dominio constante de cadena pesada puede comprender SEQ ID NO: 550 o SEQ ID NO: 551.

En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 546 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 548. En este aspecto, el anticuerpo multiespecífico puede comprender SEQ ID NO: 547 o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 549.

En este aspecto, la región Fab puede ser cualquiera de las regiones Fab descritas en la presente (ver la Tabla 21, por ejemplo). Específicamente, la región Fab de este aspecto puede comprender una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente. La región Fab de este aspecto puede comprender una VH que comprende SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende SEQ ID NO: 40.

En una forma de realización de este aspecto, el anticuerpo multiespecífico comprende una región Fab que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región Fc que comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 552. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden comprender un residuo de lisina (K) adicional en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 (K447, numeración EU). En algunas formas de realización, en los anticuerpos multiespecíficos de la invención, el residuo de glicina (G) terminal en el terminal C inmediato de la secuencia del dominio CH3 puede estar eliminado (G446, numeración EU).

Tabla 21. 747- anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab			**Región Fc**
	VH	**VL**	

Derivado de anticuerpo	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3	Bucle AB	Bucle CD	Bucle EF
ADT1-4 parental	51	53	54	79	80	81	Los residuos 358 a 362 (numeración EU) comprenden TESGP SEQ ID NO: 553 y el residuo 378 es valina	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden KFG SEQ ID NO: 554	Los residuos 413 a 421 (numeración EU) comprenden SNLRWTKGH SEQ ID NO: 555
ADT1-4-105	51	53	55	79	80	82			
ADT1-4-107	51	53	56	79	80	83			
ADT1-4-110	51	53	57	79	80	84			
ADT1-4-112	51	53	58	79	80	85			
ADT1-4-117	51	53	59	79	80	86			
ADT1-4-19	51	53	60	79	80	87			
ADT1-4-21	**52**	53	61	79	80	88			
ADT1-4-31	51	53	62	79	80	89			
ADT1-4-139	51	53	63	79	80	90			
ADT1-4-4	51	53	64	79	80	91			
ADT1-4-143	51	53	65	79	80	92			
ADT1-4-53	**52**	53	66	79	80	93			
ADT1-4-173	51	53	67	79	80	94			
ADT1-4-2	51	53	68	79	80	95			
ADT1-4-8	51	53	69	79	80	96			
ADT1-4-82	51	53	70	79	80	97			
ADT1-4-83	51	53	71	79	80	98			
ADT1-4-3	51	53	72	79	80	99			
ADT1-4-84	51	53	73	79	80	100			
ADT1-4-86	**52**	53	74	79	80	101			
ADT1-4-95	51	53	75	79	80	102			
ADT1-4-1	51	53	76	79	80	103			
ADT1-4-6	51	53	77	79	80	104			
ADT1-4-138	51	53	78	79	80	105			
ADT1-7 parental	130	131	132	144	145	146			
ADT1-7-10	130	131	133	144	145	147			
ADT1-7-15	130	131	134	144	145	148			
ADT1-7-17	130	131	135	144	145	149			
ADT1-7-18	130	131	136	144	145	150			
ADT1-7-19	130	131	137	144	145	151			
ADT1-7-20	130	131	138	144	145	152			
ADT1-7-22	130	131	139	144	145	153			
ADT1-7-23	130	131	140	144	145	154			
ADT1-7-42	130	131	141	144	145	155			

ADT1-7-3	130	131	142	144	145	156			
ADT1-7-61	130	131	143	144	145	157			

Tabla 22. 747- anticuerpos IgG1 humanos vδ1-EGFR multiespecíficos de ejemplo que tienen las CDR de anticuerpos derivados de ADT1-4 y ADT1-7 y las SEQ ID NO relacionadas

Región Fab			**Región Fc**		
Derivado de anticuerpo	**VH**	**VL**	**Bucle AB**	**Bucle CD**	**Bucle EF**
ADT1-4 parental	1	26	Los residuos 358 a 362 (numeración EU) comprenden TESGP SEQ ID NO: 553 y el residuo 378 es valina	Los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden KFG SEQ ID NO: 554	Los residuos 413 a 421 (numeración EU) comprenden SNLRWTKGH SEQ ID NO: 555
ADT1-4-105	2	27			
ADT1-4-107	3	28			
ADT1-4-110	4	29			
ADT1-4-112	5	30			
ADT1-4-117	6	31			
ADT1-4-19	7	32			
ADT1-4-21	8	33			
ADT1-4-31	9	34			
ADT1-4-139	10	35			
ADT1-4-4	11	36			
ADT1-4-143	12	37			
ADT1-4-53	13	38			
ADT1-4-173	14	39			
ADT1-4-2	15	40			
ADT1-4-8	16	41			
ADT1-4-82	17	42			
ADT1-4-83	18	43			
ADT1-4-3	19	44			
ADT1-4-84	20	45			
ADT1-4-86	21	46			
ADT1-4-95	22	47			
ADT1-4-1	23	48			
ADT1-4-6	24	49			
ADT1-4-138	25	50			
ADT1-7 parental	106	118			
ADT1-7-10	107	119			
ADT1-7-15	108	120			
ADT1-7-17	109	121			

ADT1-7-18	110	122			
ADT1-7-19	111	123			
ADT1-7-20	112	124			
ADT1-7-22	113	125			
ADT1-7-23	114	126			
ADT1-7-42	115	127			
ADT1-7-3	116	128			
ADT1-7-61	117	129			
C08	273	282			
B07	274	283			
C05	275	284			
E04	276	285			
F07	277	286			
G06	278	287			
G09	279	288			
B09	280	289			
G10	281	290			
E01	312	313			

Notablemente, en todos los ejemplos mencionados que comprenden al menos un (primer) dominio de fijación que se dirige a la cadena Vδ1 de un TCR γδ y al menos un (segundo) dominio de fijación que se dirige a EGFR se observó una funcionalidad mejorada en comparación con los controles y partes componentes (ver los Ejemplos 2 y 6 a 10 en la presente).

En conjunto, estos ejemplos no limitativos resaltan la flexibilidad de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente. Estos ejemplos no limitativos describen ese enfoque de anticuerpo multiespecífico en donde los anticuerpos o fragmentos de estos que se dirigen a la cadena Vδ1 de la línea germinal (aminoácidos 1-90 de, por ejemplo, SEQ ID NO: 272) pueden mejorarse adicionalmente mediante la combinación con dominios de fijación EGFR para formar anticuerpos multiespecíficos.

En una forma de realización, los dominios de fijación de anticuerpo multiespecífico que se dirigen a la cadena Vδ1 de un TCR γδ (la primera diana) pueden comprender (i) uno o dos o más dominios de fijación de anticuerpo, en donde cada uno comprende una cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3) y un componente de cadena liviana cognado (VL-CL) y/o (ii) uno o dos o más dominios de fijación de anticuerpo, en donde cada uno comprende un dominio variable de cadena pesada (VH o VH-CH1) y un componente de dominio variable de cadena liviana cognado (VL o VL-VC) y/o (iii) uno o dos o más dominios de fijación de anticuerpo, en donde cada uno comprende un

fragmento de anticuerpo que contiene CDR.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos un primer dominio de fijación derivado de anticuerpo que se dirige a la cadena Vδ1 de un TCR γδ y que está ligado operativamente a un segundo dominio de fijación de anticuerpo que se dirige a EGFR. Opcionalmente, dichos dominios de fijación comprenden al menos uno o más dominios de fijación VH y VL cognados, o uno o más VH-CH1-CH2-CH3 y dominios de fijación VL-CL cognados, o uno o más dominios de fijación de fragmento de anticuerpo. Dicho anticuerpo multiespecífico que comprende al menos un primer dominio de fijación derivado de anticuerpo que se dirige a la cadena Vδ1 de un TCR γδ está ligado operativamente a un segundo dominio de fijación que se fija al receptor de EGF y que comprende uno o más de las siguientes modificaciones de la cadena pesada de acuerdo con la numeración EU; L358T y/o (T359D o T359E) y/o (K360D o K360E ["LEE"] o K360S) y/o N361G y/o Q362P y/o 361.1G (en donde 361.1 es un residuo adicional entre 361 y 362) y/o A378V y/o (N384T o N384K) y/o (G385Y o G385F) y/o Q386G y/o D413S y/o (K414Y o K414N) y/o (S415W o S415L) y/o (Q418Y o Q418T o Q418V) y/o Q419K y/o N421H.

Dichas modificaciones de cadena pesada son ventajosas. Por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos un primer dominio de fijación derivado de anticuerpo que se dirige a la cadena Vδ1 de un TCR γδ ligado operativamente a un segundo dominio de fijación que se fija a EGFR y que incluye L358 y T359E de tipo silvestre y modificaciones de cadena pesada de K360E tiene una cantidad de ventajas. En primer lugar, dichas modificaciones de cadena pesada eliminan un riesgo de isomerización doble presente en la secuencia de cadena pesada no modificada. Los motivos de isomerización son inconvenientes que pueden reducir la afinidad, potencia, estabilidad y homogeneidad de un anticuerpo, que puede conducir a complicaciones en la elaboración o desarrollo del producto. Adicionalmente, un cambio de T358L devuelve una treonina a una leucina en el bucle AB de moléculas como ADT1-4-2xFS1-67. La leucina corresponde a la secuencia humana de tipo silvestre canónica en esa posición y genera una secuencia de bucle AB modificado más conservado. Un descubrimiento sorprendente adicional es que un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos un primer dominio de fijación derivado de anticuerpo que se dirige a la cadena Vδ1 de un TCR γδ ligado operativamente a un segundo dominio de fijación que se fija al receptor EGF y que comprende L358 y con modificaciones de cadena pesada de K360E y T359E conduce a una expresión mejorada en células CHO transitorias con respecto a un anticuerpo altamente relacionado que comprende T358 y D359 y D360 y que es por lo demás idéntico. Este perfil de expresión mejorado significa que el título de recolección de los anticuerpos multiespecíficos modificados por CH3 de la presente invención a partir de células CHO que comprenden dominios CH3 de cadena pesada con L358 y

E359 y E360 (tal como se incorporan en SEQ ID NO: 389) puede aumentar significativamente en comparación con anticuerpos con las modificaciones de cadena pesada de T358, D359 y D360, tal como se incorporan en SEQ ID NO: 388 y que es por lo demás idéntica. Esto resulta sorprendente, ya no se esperaría que la eliminación de los riesgos de isomerización mejore la expresión. Ver la Figura 34A. En cualquier forma de realización, el anticuerpo multiespecífico de la invención puede no comprender motivos de aminoácidos duales de isomerización DD y DG de mayor riesgo adicionales en las posiciones 359, 360 y 361 (numeración EU). En cambio, y más específicamente, en cualquier forma de realización, el anticuerpo multiespecífico de la invención puede comprender un bucle AB modificado que incluye las modificaciones T359E, K360E, N361G. Más específicamente, en cualquier forma de realización, el anticuerpo multiespecífico de la invención puede comprender un bucle AB modificado por CH3 que comprende una carga doble negativa en las posiciones 359 y 360, en donde esta carga doble negativa se proporciona con ácido glutámico (E, Glu) en lugar de ácido aspártico (D, Asp).

Un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos un primer dominio de fijación derivado de anticuerpo que se dirige a la cadena Vδ1 de un TCR γδ está ligado operativamente a un segundo dominio de fijación que comprende SEQ ID NO: 385 o SEQ ID NO: 386 o SEQ ID NO: 391 o SEQ ID NO: 392 o SEQ ID NO: 520 o SEQ ID NO: 521 o SEQ ID NO: 530 o SEQ ID NO: 531 o SEQ ID NO: 539 o SEQ ID NO: 540 o SEQ ID NO: 508 o SEQ ID NO: 509 o SEQ ID NO: 550 o SEQ ID NO: 551 o variantes de fijación funcionalmente equivalentes de estas y que se dirigen a EGFR. Opcionalmente, los anticuerpos multiespecíficos comprenden SEQ ID NO: 389; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 432; o SEQ ID NO: 400; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 436; o SEQ ID NO: 516; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 518; o SEQ ID NO: 517; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 519, o SEQ ID NO: 526; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 528; o SEQ ID NO: 527; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 529; o SEQ ID NO: 535; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 537; o SEQ ID NO: 536; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 538; o SEQ ID NO: 504; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 506; o SEQ ID NO: 505; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 507; o SEQ ID NO: 388; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 431; o SEQ ID NO: 399; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 435; o SEQ ID NO: 546; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 548; o SEQ ID NO: 547; o SEQ ID NO: 414 y SEQ ID NO: 549; o SEQ ID NO: 378; o SEQ ID NO: 425 y SEQ ID NO: 426; o SEQ ID NO: 379; o SEQ ID NO: 421 y SEQ ID NO: 437; o SEQ ID NO: 380; o SEQ ID NO: 423 y SEQ ID NO: 427.

En un aspecto de la invención, se pueden usar anticuerpos multiespecíficos de la invención en cantidades terapéuticamente eficaces para tratar una enfermedad o un trastorno para mejorar al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno.

En una forma de realización, se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la

presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ en un formato de anticuerpo multiespecífico en donde dicho anticuerpo multiespecífico se aplica a células Vδ1+ para medir el efecto conferido por dichas células Vδ1+ de entidad multiespecífica (por ejemplo, tras dicho fenotipo de Vδ1+ y/o citotoxicidad y/o especificidad para células enfermas y/o mejora de estas).

Tratamientos conjuntos

Los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden usarse en ciertos tratamientos conjuntos. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos pueden combinarse con un modulador de un antígeno de cáncer o antígeno asociado al cáncer, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en AFP, AKAP-4, ALK, alfafetoproteína, receptor androgénico, B7H3, BAGE, BCA225, BCAA, Bcr-abl, beta-Catenina, beta-HCG, gonadotropina coriónica humana beta, BORIS, BTAA, CA 125, CA 15-3, CA 195, CA 19-9, CA 242, CA 27.29, CA 72-4, CA-50, CAM 17.1, CAM43, anhidrasa carbónica IX, antígeno carcinoembrionario, CD22, CD33/IL3Ra, CD68\P1, CDK4, CEA, condroitín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4), c-Met, CO-029, CSPG4, ciclina B1, proteína asociada a la ciclofilina C, CYP1B1, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, EphrinB2, antígenos del virus de Epstein Barr EBVA, ERG (gen de fusión TMPRSS2ETS), ETV6-AML, FAP, FGF-5, antígeno relacionado a Fos 1, Fucosil GM1, G250, Ga733\EpCAM, GAGE-1, GAGE-2, GD2, GD3, antígeno asociado al glioma, GloboH, glicolípido F77, GM3, GP 100, GP 100 (Pmel 17), H4-RET, HER-2/neu, HER-2/Neu/ErbB-2, antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), HPV E6, HPV E7, hTERT, HTgp-175, telomerasa transcriptasa inversa humana, idiotipo, receptor de IGF-I, IGF-II, IGH-IGK, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, carboxil esterasa intestinal, K-ras, LAGE-1a, LCK, AFP reactivo a la lectina, legumaína, LMP2, M344, MA-50, proteína de fijación a Mac-2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-1/MelanA, M-CSF, condroitín sulfato proteoglicano asociado al melanoma (MCSP), mesotelina, MG7-Ag, ML-IAP, MN-CA IX, MOV18, MUC1, Mum-1, hsp70-2, MYCN, MYL-RAR, NA17, NB/70K, antígeno neuroglial 2 (NG2), elastasa de neutrófilos, nm-23H1, NuMa, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO, NY-ESO-1, NY-ESO-1, OY-TES1, p15, p16, p180erbB3, p185erbB2, p53, p53 mutante, Page4, PAX3, PAX5, PDGFR-beta, PLAC1, ácido polisiálico, antígeno tumoral de carcinoma de próstata 1 (PCTA-1), antígeno específico de la próstata, fosfatasa ácida prostática (PAP), Proteinasa3 (PR1), PSA, PSCA, PSMA, RAGE-1, Ras, Ras mutante, RCAS1, RGS5, RhoC, ROR1, RU1, RU2 (AS), SART3, SDCCAG16, sLe(a), proteína de esperma 17, SSX2, STn, survivina, TA-90, TAAL6, a TAG-72, telomerasa, tiroglobulina, Tie 2, TLP, Tn, TPS, TRP-1, TRP-2, TRP-2, TSP-180, tirosinasa, VEGF, VEGFR2, VISTA, WT1, XAGE 1, 43-9F, 5T4 y 791Tgp72.

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos pueden combinarse con un modulador de un antígeno inmunomodulador, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste

en B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-DC (CD273), B7-H1 (CD274), B7-H2 (CD275), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), B7-H5 (VISTA), BTLA (CD272), CD137, CD137L, CD24, CD27, CD28, CD38, CD40, CD40L (CD154), CD54, CD59, CD70, CTLA4 (CD152), CXCL9, GITR (CD357), HVEM (CD270), ICAM-1 (CD54), ICOS (CD278), LAG-3 (CD223), OX40 (CD134), OX40L (CD252), PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274), TIGIT, CD314, CD334, CD335, CD337, y TIM-3 (CD366).

En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos pueden combinarse con un modulador de un antígeno CD, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32A, CD32B, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85B, CD85C, CD85D, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD85M, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140A, CD140B, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158, CD158A, CD158B1, CD158B2, CD158C, CD158D, CD158E1, CD158E2, CD158F1, CD158F2, CD158G, CD158H, CD158I, CD158J, CD158K, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218a, CD218b, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255,

CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300A, CD300C, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370 y CD371.

En algunas formas de realización, los moduladores pueden ser antagonistas o agonistas. Los moduladores adecuados incluyen anticuerpos, proteínas de fusión o moléculas pequeñas.

Inmunoconjugados

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención pueden conjugarse con una porción terapéutica, tal como una citotoxina o un agente quimioterapéutico. Tales conjugados pueden denominarse inmunoconjugados. Como se usa en la presente, el término "inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo que está ligado química o biológicamente a otra porción, tal como una citotoxina, un agente radioactivo, una citocina, un interferón, una porción diana o indicadora, una enzima, una toxina, un péptido o proteína o un agente terapéutico. El anticuerpo puede ligarse a la citotoxina, agente radioactivo, citocina, interferón, porción diana o indicadora, enzima, toxina, péptido o agente terapéutico en cualquier ubicación de la molécula siempre que pueda fijarse a su diana. Los ejemplos de inmunoconjugados incluyen conjugados anticuerpo-fármaco y proteínas de fusión anticuerpo-toxina. En una forma de realización, el agente puede ser un segundo anticuerpo diferente a Vδ1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo puede conjugarse con un agente específico para una célula de tumor o una célula infectada viralmente. El tipo de porción terapéutica que puede conjugarse con el anticuerpo anti-Vδ1 tendrá en cuenta la afección que se tratará y el efecto terapéutico que se desea lograr. En una forma de realización, el agente puede ser un segundo anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a una molécula distinta de Vδ1.

Reactividad cruzada con *Macaca fascicularis*

Adecuadamente, los anticuerpos multiespecíficos exhiben reactividad cruzada tanto con TRDV1 humana SEQ ID NO: 272 (incluso la variante polimórfica, es decir, SEQ ID NO: 306) como con TRDV1 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 308). La reactividad cruzada es claramente útil para proporcionar anticuerpos que pueden usarse en estudios en animales *in vivo* durante la evaluación preclínica.

Los presentes inventores identificaron sorprendentemente una mutación de marco que puede conferir una mayor fijación de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-Vδ1xEGFR y fragmentos de fijación al antígeno de estos, a antígenos de *Macaca fascicularis*. La mutación de marco no afecta negativamente la afinidad del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este con la versión humana correspondiente del antígeno. La mutación es la mutación del residuo de serina en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de una secuencia variable de la cadena liviana kappa en un residuo que no es serina (por ejemplo, un residuo no polar y/o que no es de la línea germinal humana). Los aminoácidos no polares pueden seleccionarse del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, metionina, leucina e isoleucina. Los aminoácidos que no son de la línea germinal pueden seleccionarse del grupo que consiste en arginina, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Los aminoácidos no polares y que no son de la línea germinal (es decir, los aminoácidos que no son polares y no son de la línea germinal) pueden seleccionarse del grupo que consiste en glicina, valina, metionina, leucina e isoleucina. En algunas formas de realización, la mutación es la mutación del residuo de serina en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de una secuencia variable de la cadena liviana kappa en un residuo de leucina. La mutación es una sustitución directa tal que la longitud total de la cadena no cambia. Por lo tanto, se elimina la serina en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT y se la reemplaza directamente por otro aminoácido (tal como un aminoácido no polar y/o que no es de la línea germinal humana, tal como una leucina). La sustitución puede lograrse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido por la persona del oficio de nivel medio.

Las referencias en la presente a anticuerpos que comprenden una secuencia variable de la cadena liviana kappa que comprende un residuo en la posición 74 de acuerdo con la numeración IMGT que no es serina pueden definirse alternativamente como anticuerpos que comprenden una secuencia variable de la cadena liviana que comprende una región LFR1, una región LCDR1, una región LFR2, una región LCDR2, una región LFR3, una región LCDR3 y una región LFR4, en donde la región LFR3 comprende un residuo en la posición 74 de acuerdo con la numeración IMGT que no es serina (por ejemplo, un aminoácido no polar y/o que no es de la línea germinal humana, tal como un residuo de leucina). Tal definición alternativa puede aplicarse a todos los anticuerpos divulgados en la presente que comprenden una secuencia variable de la cadena liviana kappa que comprende un residuo en la posición 74 de acuerdo con la numeración IMGT que no es serina (por ejemplo, un aminoácido no polar y/o que no es de la línea germinal humana, tal como un residuo de leucina).

En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos multiespecíficos anti-

variable delta 1 (anti-Vδ1)xEGFR de TCR o fragmentos de fijación al antígeno de estos que comprenden una secuencia variable de la cadena liviana kappa, en la que el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la secuencia variable de la cadena liviana no es una serina (por ejemplo, un aminoácido no polar y/o que no es de la línea germinal humana, tal como un residuo de leucina). En algunas formas de realización, el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la secuencia variable de la cadena liviana es una leucina. Adecuadamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG1.

Los anticuerpos multiespecíficos anti-Vδ1xEGFR y fragmentos de fijación al antígeno de estos proporcionados en la presente pueden proporcionarse con la sustitución en la posición 74 (de acuerdo con el sistema de numeración IMGT) de la secuencia variable de la cadena liviana. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos Vδ1xEGFR y fragmentos de fijación al antígeno y variantes de estos descritos en la presente pueden comprender una secuencia variable de la cadena liviana kappa que comprende un residuo distinto de serina en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT (por ejemplo, un aminoácido no polar y/o que no es de la línea germinal humana, tal como un residuo de leucina). En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos anti-Vδ1xEGFR y fragmentos de fijación al antígeno y variantes de estos descritos en la presente pueden comprender una secuencia variable de la cadena liviana kappa que comprende un residuo de leucina en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT. Las formas de realización que comprenden una mutación en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de una cadena liviana kappa pueden ser particularmente relevantes para anticuerpos derivados de ADT1-4, si bien la mutación puede aplicarse de igual manera en otros anticuerpos. Por ejemplo, se observa que la posición 74 de la cadena liviana no presenta una alta conservación en las diferentes líneas germinales de la cadena liviana kappa/lambda. También se observa que las diferentes líneas germinales de la cadena liviana contienen aminoácidos con polaridad y/o carga diferentes en esta posición, desde no polar (por ejemplo, alanina) hasta polaridad neutra (por ejemplo, serina) y carga negativa o positiva (por ejemplo, aspartato o asparagina, respectivamente). Se entiende que la polaridad/carga del aminoácido en cualquier posición dada puede afectar la estructura proteica. Por ejemplo, se entiende que un cambio de la polaridad y la carga puede afectar la hidrofobicidad y la tendencia de un aminoácido a estar más expuesto en la superficie o más enterrado. Más allá de esto, este hallazgo notable resalta que los cambios de aminoácidos no conservadores en la posición 74 de la cadena liviana pueden modificar la afinidad con una diana seleccionada en más de 10 veces. Por lo tanto, además de mejorar la afinidad como se detalla en la presente, el uso de este conocimiento puede ofrecer un nuevo enfoque para aumentar o disminuir la afinidad más

ampliamente. Por ejemplo, un método que comprende cambiar el residuo en la posición 74 de más polar a no polar, o, por ejemplo, de no polar a más cargado, puede ser de mayor preferencia que métodos complejos/engorrosos de mutagénesis, tales como mutagénesis de saturación, etc., cuando se desea aumentar o disminuir la afinidad con un anticuerpo dado.

En una forma de realización adicional de la invención se proporciona también un método para mutar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende proporcionar un anticuerpo que comprende una cadena liviana kappa que tiene una serina en la posición 74 de la secuencia variable de la cadena liviana de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, y mutar la serina en un residuo diferente, por ejemplo, un aminoácido no polar y/o que no es de la línea germinal humana, tal como una leucina. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 26 tanto antes como después de introducir la mutación en la posición 74 de la secuencia variable de la cadena liviana. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es 100 % idéntica a SEQ ID NO: 1 con la excepción de la mutación en la posición 74 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es 100 % idéntica a SEQ ID NO: 26 con la excepción de la mutación en la posición 74.

En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 106 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 118 tanto antes como después de introducir la mutación en la posición 74 de la secuencia variable de la cadena liviana. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es 100 % idéntica a SEQ ID NO: 106 con la excepción de la mutación en la posición 74 y una VL

que comprende una secuencia de aminoácidos que es 100 % idéntica a SEQ ID NO: 118 con la excepción de la mutación en la posición 74.

En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo que comprende:

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 273 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 282 tanto antes como después de introducir la mutación;

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 283 tanto antes como después de introducir la mutación;

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 275 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 284 tanto antes como después de introducir la mutación;

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 276 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 285 tanto antes como después de introducir la mutación;

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 277 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 286 tanto antes como después de introducir la mutación;

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 278 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 287 tanto antes como después de introducir la mutación;

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 288 tanto antes como después de introducir la mutación;

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 280 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 289 tanto antes como después de introducir la mutación;

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos

99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 290 tanto antes como después de introducir la mutación; o

una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 312 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 313 tanto antes como después de introducir la mutación.

En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo que comprende:

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 273 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 282;

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 283;

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 275 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 284;

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 276 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 285;

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 277 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 286;

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 278 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 287;

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 288;

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 280 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 289;

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 290; o

una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 312 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 313.

El anticuerpo producido con tales métodos tiene 100 % de identidad con las secuencias de

VH y VL especificadas, con la excepción de la mutación en la posición 74.

En algunas formas de realización, la mutación en la posición 74 aumenta la afinidad del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este para un antígeno de *Macaca fascicularis* (cyno) homólogo. El aumento de la afinidad del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es relativa a la afinidad del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este antes de introducir la mutación (cuando se mide en condiciones iguales o sustancialmente iguales). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es un anticuerpo anti-variable delta 1 (anti-Vδ1) de TCR o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a una cadena variable delta 1 (Vδ1) humana de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ (por ejemplo, SEQ ID NO: 272 y 306) antes y después de introducir la mutación, y el anticuerpo tiene mayor afinidad con una cadena variable delta 1 (Vδ1) de *Macaca fascicularis* de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ (por ejemplo, SEQ ID NO: 308) después de introducir la mutación.

Secuencias de polinucleótidos y vectores de expresión

En un aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica el anticuerpo multiespecífico de la invención. En una forma de realización, el polinucleótido comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 199 a 222, 224 a 247, 249 a 259 o 261 a 271. En una forma de realización adicional, el polinucleótido comprende o consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 199 a 222, 224 a 247, 249 a 259 o 261 a 271. En un aspecto adicional se proporciona un cADN que comprende dicho polinucleótido.

En un aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las porciones de SEQ ID NO: 199 a 222, 224 a 247, 249 a 259 o 261 a 271 y que codifica CDR1, CDR2 y/o CDR3 del dominio variable de cadena inmunoglobulina codificado.

En un aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las porciones de SEQ ID NO: 199 a 222, 224 a 247, 249 a 259 o 261 a 271 y que codifica FR1, FR2, FR3 y/o FR4 del dominio variable de cadena inmunoglobulina codificado.

La presente invención también proporciona vectores de expresión y plásmidos que comprenden las secuencias de polinucleótidos de la invención. En algunas formas de realización, los vectores de expresión comprenden una secuencia que tiene al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 99 % de identidad de

secuencia o 100 % de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 199 a 222 o 249 a 259 (que codifican regiones pesadas variables). En algunas formas de realización, los vectores de expresión comprenden una secuencia que tiene al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 99 % de identidad de secuencia o 100 % de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 224 a 247 o 261 a 271 (que codifican regiones livianas variables). Tales vectores de expresión pueden usarse en pares, al emparejar adecuadamente las secuencias variables de las cadenas pesada y liviana de acuerdo con el emparejamiento de diversas secuencias de aminoácidos que proporciona los anticuerpos multiespecíficos de la invención divulgados en la presente. En algunas formas de realización, los vectores de expresión comprenden una secuencia que tiene al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 99 % de identidad de secuencia o 100 % de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 199 a 222 o 249 a 259 (que codifican una región pesada variable) y comprenden además una secuencia que tiene al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 99 % de identidad de secuencia o 100 % de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 224 a 247 o 261 a 271 (que codifican una región liviana variable). Nuevamente, las secuencias se pueden proporcionar en pares específicos descritos en la presente para codificar los anticuerpos multiespecíficos de la invención.

La presente invención también proporciona secuencias de polinucleótidos y vectores de expresión y plásmidos que codifican todas las secuencias de anticuerpos divulgadas en la presente, incluso cualesquier secuencias de anticuerpos variantes divulgadas en la presente que comprenden opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos.

Los polinucleótidos y vectores de expresión de la invención también se pueden describir en referencia a la secuencia de aminoácidos codificada. Por lo tanto, en una forma de realización, el polinucleótido comprende o consiste en una secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 197.

Para expresar los anticuerpos multiespecíficos, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, los polinucleótidos que codifican cadenas livianas y pesadas de longitud parcial o completa, como se describen en la presente, se insertan en vectores de expresión de modo tal que los genes están ligados operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. Por lo tanto, en un aspecto de la invención se proporciona un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos definida en la presente. En una forma de realización, el vector de expresión comprende la región VH de cualquiera de SEQ ID NO: 199 a 222 o 249 a 259. En otra forma de realización, el vector de expresión comprende la región VL de cualquiera de SEQ ID NO: 224 a 247 o 261 a 271.

Se entenderá que las secuencias de nucleótidos descritas en la presente pueden comprender secuencias adicionales que codifican residuos de aminoácidos para ayudar con la traducción, purificación y detección, aunque se pueden usar secuencias alternativas según el sistema de expresión usado. Estas secuencias opcionales se pueden eliminar, modificar o sustituir si se adoptan estrategias alternativas de diseño, traducción, purificación o detección.

Se pueden realizar mutaciones al ADN o cADN que codifica polipéptidos que son silenciosas en cuanto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que proporcionan codones preferidos para la traducción en un huésped particular. Son conocidos los codones preferidos para traducción de un ácido nucleico en, por ejemplo, *E. coli* y *S. cerevisiae*, así como de mamífero, específicamente ser humano.

La mutación de polipéptidos se puede lograr por ejemplo mediante sustituciones, adiciones o eliminaciones en un ácido nucleico que codifica el polipéptido. Las sustituciones, adiciones o eliminaciones en un ácido nucleico que codifica el polipéptido se pueden introducir mediante muchos métodos, que incluyen por ejemplo, PCR propensa a errores, intercambio, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis de casete, mutagénesis progresiva de conjunto, mutagénesis exponencial de conjunto, mutagénesis de sitio específico, reensamblaje génico, síntesis génica artificial, mutagénesis de saturación de sitio de gen (GSSM), reensamblaje de ligadura sintética (SLR) o una combinación de estos métodos. Las modificaciones, adiciones o eliminaciones en un ácido nucleico también se pueden introducir mediante un método que comprende recombinación, recombinación de secuencia progresiva, mutagénesis de ADN modificada por fosfotioato, mutagénesis de plantilla que contiene uracilo, mutagénesis dúplex espaciada, mutagénesis de reparación de error de apareamiento puntual, mutagénesis de cepa huésped con deficiencia de reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de eliminación, mutagénesis de restricción-selección, mutagénesis de restricción-purificación, mutagénesis de ensamblaje, creación de multímero de ácido nucleico quimérico o una combinación de estos.

En particular, se puede usar síntesis génica artificial. Un gen que codifica un polipéptido de la invención puede producirse sintéticamente mediante, por ejemplo, síntesis de ADN en fase sólida. Genes enteros se pueden sintetizar *de novo*, sin la necesidad de ADN de plantilla precursor. Para obtener el oligonucleótido deseado, los bloques de construcción se acoplan secuencialmente a la cadena de oligonucleótidos creciente en el orden requerido por la secuencia del producto. Tras completar el ensamble de cadena, el producto se libera de la fase sólida a la solución, se desprotege y se recolecta. Los productos se pueden aislar mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para obtener los oligonucleótidos deseados con alta pureza.

Los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, plásmidos, retrovirus, cósmidos,

cromosomas artificiales de levadura (YAC) y episomas derivados de virus de Epstein-Barr (EBV). El polinucleótido se liga en un vector de modo que tales secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplan con su función prevista de regular la transcripción y la traducción del polinucleótido. Las secuencias de expresión y/o control pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) 5′ a la secuencia codificante, señales de empalme para intrones y codones de detención. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se seleccionan de modo que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. Por ejemplo, las secuencias pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican versiones de fragmentos variables monocatenarios de los anticuerpos de la invención, que comprenden una región VH y una región VL unidas por un ligador sintético (por ejemplo, que codifica SEQ ID NO: 291). Se entenderá que los polinucleótidos o vectores de expresión de la invención pueden comprender la región VH, la región VL o ambas (incluido opcionalmente el ligador). Por lo tanto, los polinucleótidos que codifican las regiones VH y VL se pueden insertar en vectores separados, alternativamente las secuencias que codifican ambas regiones se insertan en el mismo vector de expresión. Los polinucleótidos se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el polinucleótido y vector, o ligadura de extremo romo si no hay sitios de restricción).

Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción adecuados diseñados por ingeniería genética para que cualquier secuencia VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se describe en la presente. El vector de expresión también puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción del anticuerpo (o fragmento de fijación al antígeno de este) a partir de una célula huésped. El polinucleótido puede clonarse en el vector de modo que el péptido de señal quede ligado en el marco al terminal amino del anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heteróloga (es decir, un péptido de señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

En un aspecto de la invención se proporciona una célula (por ejemplo, una célula huésped, tal como una célula huésped recombinante) que comprende el polinucleótido o vector de expresión como se define en la presente. Se entenderá que la célula puede comprender un primer vector que codifica la cadena liviana del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, y un segundo vector que codifica la cadena pesada del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este. Alternativamente, tanto la cadena pesada como la liviana codifican en el mismo vector de expresión introducido en la célula.

En una forma de realización, el polinucleótido o vector de expresión codifica un anclaje de

membrana, o dominio transmembrana fusionado al anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este se presenta en una superficie extracelular de la célula.

La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped. En la técnica se conocen métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos y estos métodos incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación de fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, inyección biolística y microinyección directa del ADN en núcleos. Además, se pueden introducir moléculas de ácido nucleico en células de mamíferos mediante vectores virales.

Las líneas de células de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, entre otros, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, células 3T3 y varias otras líneas celulares. Las células huésped de mamíferos incluyen células humanas, bovinas y de ratón, rata, perro, mono, cerdo, cabra, caballo y hámster. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan a través de determinar qué líneas celulares tienen niveles altos de expresión. Otras líneas celulares que se pueden utilizar son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9, células de anfibio, células bacterianas, células vegetales y células fúngicas. Los fragmentos de fijación al antígeno de anticuerpos, tales como los fragmentos scFv y Fv, se pueden aislar y expresar en *E. coli* con métodos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos se producen al cultivar las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, con mayor preferencia, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Luego, los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo con métodos estándar de purificación de proteínas.

Los anticuerpos (o fragmentos) de la invención se pueden obtener y manipular con las técnicas divulgadas para el ejemplo en Green y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012) 4.ª Edición Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse con tecnología de hibridoma, al fusionar un linfocito B que produce anticuerpos específicos con una célula de mieloma (cáncer de linfocitos B) que se selecciona por su capacidad para crecer en cultivo de tejido y por la ausencia de síntesis de cadena de anticuerpos.

Un anticuerpo monoclonal dirigido a un antígeno determinado puede, por ejemplo,

obtenerse al:

a) inmortalizar linfocitos obtenidos de la sangre periférica de un animal previamente inmunizado con un antígeno determinado, con una célula inmortal y preferentemente con células de mieloma, para formar un hibridoma,

b) cultivar las células inmortalizadas (hibridoma) formadas y recuperar las células que producen los anticuerpos que tienen la especificidad deseada.

Alternativamente, no se requiere el uso de una célula de hibridoma. Los anticuerpos capaces de fijarse a los antígenos diana como se describen en la presente pueden aislarse de una colección de anticuerpos adecuada mediante prácticas de rutina, por ejemplo, con expresión en fago, expresión de levadura, expresión ribosómica o tecnología de expresión en mamíferos conocida en la técnica. En consecuencia, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse, por ejemplo, mediante un proceso que comprende las etapas de:

a) clonar en vectores, especialmente en fagos y más particularmente bacteriófagos filamentosos, secuencias de ADN o cADN obtenidas de linfocitos, especialmente linfocitos de sangre periférica de un animal (inmunizados previamente de manera adecuada con antígenos determinados),

b) transformar las células procariotas con los vectores anteriores en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos,

c) seleccionar los anticuerpos al someterlos a la selección de afinidad con antígeno,

d) recuperar los anticuerpos que tienen la especificidad deseada.

Opcionalmente, también se puede elaborar fácilmente un polinucleótido aislado que codifica los anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente y que se fijan a la cadena Vδ1 de una γδ con el fin de generar cantidades suficientes para su uso como medicamentos para mejorar los signos o síntomas de una enfermedad. Cuando se emplean como un medicamento de esta manera, los polinucleótidos de interés por lo general se ligan primero operativamente a un vector de expresión o casete de expresión diseñado para expresar dichos anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos en un sujeto o paciente. En la técnica se conocen tales casetes de expresión y métodos de administración de polinucleótidos o los que a veces se denominan medicamentos "basados en ácido nucleico". Se puede encontrar una reseña reciente en Hollevoet y Declerck (2017) J. Transl. Med. 15(1): 131.

También se proporciona un método para la producción de un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno o variante de este, que comprende cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo celular en condiciones para expresar la secuencia de ácidos nucleicos codificado del plásmido o vector dentro de la célula. El método puede comprender además obtener el anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno o variante de este del

sobrenadante de cultivo celular. El anticuerpo obtenido puede luego formularse en una composición farmacéutica. Además, se proporciona un método para producir una célula que expresa un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno o variante de este, que comprende transfectar dicha célula con un plásmido o vector de la invención. Dichas células luego pueden cultivarse para la producción del anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno o variante de este.

Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición que comprende los anticuerpos multiespecíficos como se definen en la presente. En tales formas de realización, la composición puede comprender el anticuerpo, opcionalmente en combinación con otros excipientes. También se incluyen composiciones que comprenden uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, agentes activos adecuados para tratar las enfermedades mencionadas en la presente).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente, junto con un diluyente o portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Por lo general, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo de la invención y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Como se usa en la presente, "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluyen todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardadores de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen uno o más de agua, solución salina, sales, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de estos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Las sustancias aceptables desde el punto de vista farmacéutico tales como humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o amortiguadores, que mejoran la vida útil o eficacia del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en diversas formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosis líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables o infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de

administración y la aplicación terapéutica previstos. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles.

El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular, intratecal). En una forma de realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión intravenosa o inyección. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Por lo general, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración farmacológica alta.

Dentro del alcance de la invención se encuentra el uso de la composición farmacéutica de la invención en métodos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades como se describen en la presente como un complemento de, o en conjunto con, otros tratamientos establecidos usados normalmente en el tratamiento de tales enfermedades.

En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo, la composición o la composición farmacéutica se administra de manera secuencial, simultánea o separada con al menos un agente activo.

Métodos de tratamiento

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo multiespecífico aislado como se define en la presente para su uso como un medicamento. Las referencias en la presente a un anticuerpo "para su uso" como un medicamento o en tratamiento están limitadas a la administración del anticuerpo a un sujeto.

En una forma de realización, el anticuerpo multiespecífico es para su uso en el tratamiento contra el cáncer. En una forma de realización, la invención es un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto que lo necesite, que comprende la etapa de administrar un anticuerpo multiespecífico al sujeto. En diversas formas de realización, la enfermedad o trastorno es cáncer. En una forma de realización, el anticuerpo multiespecífico es para su uso en el tratamiento contra el cáncer y conduce a la muerte de las células enfermas mientras preserva las células sanas. En una forma de realización adicional, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es para su uso en el tratamiento contra el cáncer.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es para su uso en el tratamiento contra el cáncer. En una forma de realización adicional, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este es para su uso en el tratamiento contra el cáncer.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona la composición farmacéutica como se define en la presente para su uso como un medicamento. En una forma de

realización, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento contra el cáncer. En una forma de realización adicional, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento contra el cáncer.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo multiespecífico aislado como se define en la presente. En diversas formas de realización, modular una respuesta inmunitaria en un sujeto comprende fijar o dirigir los linfocitos T γδ, activar los linfocitos T γδ, causar o aumentar la proliferación de los linfocitos T γδ, causar o aumentar la expansión de los linfocitos T γδ, causar o aumentar la desgranulación de los linfocitos T γδ, causar o aumentar la actividad de inactivación mediada por los linfocitos T γδ, causar o aumentar la actividad de inactivación mediada por los linfocitos T γδ mientras se preservan las células sanas, causar o aumentar la citotoxicidad de los linfocitos T γδ, causar o aumentar la citotoxicidad de los linfocitos T γδ mientras se preservan las células sanas, causar o aumentar la movilización de los linfocitos T γδ, aumentar la supervivencia de los linfocitos T γδ o aumentar la resistencia al agotamiento de los linfocitos T γδ. Modular la respuesta inmunitaria en un sujeto puede comprender además la fijación o el direccionamiento al segundo antígeno. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la fijación del segundo antígeno, en particular cuando es un antígeno inmunomodulador, puede estimular la inmunomodulación a través del segundo antígeno, además de la inmunomodulación a través de la fijación del anticuerpo multiespecífico a TRDV1. Por lo tanto, la modulación de la respuesta inmunitaria puede comprender la modulación a través de dos vías de señalización diferentes, una primera vía de señalización modulada a través del acoplamiento del antígeno TRDV1 y una segunda vía de señalización modulada a través del acoplamiento de un segundo antígeno inmunomodulador.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para tratar un tipo de cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo multiespecífico como se define en la presente. Alternativamente, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

De acuerdo con aspectos adicionales de la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente para la elaboración de un medicamento, por ejemplo, en el tratamiento contra el cáncer.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este se administra a un sujeto, en donde el sujeto tiene cáncer.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona la composición farmacéutica como se define en la presente para su uso como un medicamento. En una forma de

realización, la composición farmacéutica se administra a un sujeto, en donde el sujeto tiene cáncer.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo multiespecífico aislado como se define en la presente a un sujeto, en donde el sujeto tiene cáncer. Alternativamente, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

De acuerdo con aspectos adicionales de la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente para la elaboración de un medicamento, por ejemplo, para la administración a un sujeto, en donde el sujeto tiene cáncer.

En diversas formas de realización, el tipo de cáncer que se puede tratar con los métodos y composiciones divulgados incluyen, entre otros, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer de apéndice, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, tumor teratoideo/rabdoideo atípico del sistema nervioso central, tumores embrionales del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, craneofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores pineales parenquimatosos de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma, glioma hipotalámico y de la vía óptica, tumores cerebrales y de médula espinal, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor teratoideo/rabdoideo atípico del sistema nervioso central, tumores embrionales del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, cáncer de cuello uterino, cordoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer de esófago, tumores de la familia de Ewing, tumor extragonadal de células germinales, cáncer extrahepático de las vías biliares, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, glioma, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebral, glioma hipotalámico y de la vía óptica, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (de hígado), histocitosis de células de Langerhans, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma hipotalámico y de la vía óptica, melanoma intraocular, tumores de células de islotes, cáncer de riñón (de células renales), histocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia

linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma de Burkitt, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma no Hodgkin, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenström, histiocitoma fibroso maligno óseo y osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con sitio primario oculto, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y de seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno óseo, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer de páncreas, papilomatosis, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumores pineales parenquimatosos de diferenciación intermedia, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (de riñón), de pelvis renal y uréter, carcinoma de la vía respiratoria que involucra el gen nut en el cromosoma 15, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, tumores de la familia de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, síndrome de Sézary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de células de Merkel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de linfocitos T, cáncer de testículo, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms. En diversas formas de realización, se trata el tipo de cáncer que puede tratarse con los métodos y composiciones divulgados mientras se preservan las células sanas.

En diversas formas de realización, el tipo de cáncer que puede tratarse con los métodos y composiciones divulgados incluye tipos de cáncer EGFR positivos (EGFR+).

En una forma de realización, la invención es un método para activar al menos un linfocito T γδ en un sujeto, que comprende la etapa de administrar un anticuerpo multiespecífico como se

define en la presente.

En una forma de realización, la invención es un método para causar o aumentar la proliferación de linfocitos T γδ en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico como se define en la presente.

En una forma de realización, la invención es un método para causar o aumentar la desgranulación de linfocitos T γδ en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico como se define en la presente.

En una forma de realización, la invención es un método para causar o aumentar la actividad de inactivación de los linfocitos T γδ (por ejemplo, la actividad de inactivación mediada por los linfocitos T) en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente. En una forma de realización, la invención es un método para causar o aumentar la actividad de inactivación de los linfocitos T γδ (por ejemplo, la actividad de inactivación mediada por los linfocitos T) en un sujeto, mientras se preservan las células sanas, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente.

En una forma de realización, la invención es un método para causar o aumentar la citotoxicidad de linfocitos T γδ en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente. En una forma de realización, la invención es un método para causar o aumentar la citotoxicidad de linfocitos T γδ en un sujeto, mientras se preservan las células sanas, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo anti-Vδ1 o fragmento de fijación al antígeno de este como se define en la presente.

En una forma de realización, la invención es un método para causar o aumentar la movilización de linfocitos T γδ en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico como se define en la presente.

En una forma de realización, la invención es un método para aumentar la supervivencia de linfocitos T γδ en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico como se define en la presente.

En una forma de realización, la invención es un método para causar o aumentar la resistencia al agotamiento de linfocitos T γδ en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico como se define en la presente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo multiespecífico en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria.

Usos de anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo multiespecífico como se describe en la presente para estudiar el reconocimiento de antígenos, activación, transducción de señales o función de los linfocitos T γδ (en particular linfocitos T Vδ1). Como se describe en la presente, se ha demostrado que los anticuerpos están activos en ensayos que se pueden utilizar para investigar la función de los linfocitos T γδ. Tales anticuerpos también pueden ser útiles para inducir la proliferación de linfocitos T γδ, por lo que se los puede usar en métodos para expandir los linfocitos T γδ (tales como linfocitos T Vδ1).

Se pueden usar anticuerpos que se fijan a la cadena Vδ1 para detectar linfocitos T γδ. Por ejemplo, el anticuerpo se puede etiquetar con una etiqueta detectable o una molécula indicadora o se puede usar como un ligando de captura para aislar y/o detectar selectivamente los linfocitos T Vδ1 en una muestra. Los anticuerpos etiquetados se utilizan en muchos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, inmunohistoquímica y ELISA.

La etiqueta detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S o ^{125}I; una porción fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína, o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Luego, las etiquetas fluorescentes aplicadas a los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden usarse en métodos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Por lo tanto, en diversas formas de realización, la invención incluye métodos *in vivo* para modular los linfocitos T γδ, métodos de fijación a los linfocitos T γδ, métodos de direccionamiento a los linfocitos T γδ, métodos para activar los linfocitos T γδ, métodos para proliferar los linfocitos T γδ, métodos para expandir los linfocitos T γδ, métodos para detectar los linfocitos T γδ, métodos para causar la desgranulación de los linfocitos T γδ, métodos para causar la actividad de inactivación mediada por linfocitos T γδ y métodos para seleccionar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos, en donde los métodos comprenden la etapa de administrar un anticuerpo multiespecífico o fragmento de fijación al antígeno de este a un sujeto como se describe en la presente.

Medicamentos para modular linfocitos T gamma delta

El anticuerpo multiespecífico como se describe en la presente puede usarse para modular o es útil en la modulación de los linfocitos T de cadena variable delta 1 (Vδ1) en un paciente *in situ* (es decir, *in vivo*). Los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden estar comprendidos en medicamentos para tales propósitos.

La modulación de los linfocitos T Vδ1 puede incluir:

- expansión de los linfocitos T Vδ1, por ejemplo, al aumentar selectivamente la cantidad de

linfocitos T Vδ1 o la promoción de supervivencia de linfocitos T Vδ1;

- estimulación de los linfocitos T Vδ1, por ejemplo, al aumentar la potencia de linfocitos T Vδ1, es decir, al aumentar la inactivación de células diana;

- prevención del agotamiento de linfocitos T Vδ1, por ejemplo, al aumentar la persistencia de los linfocitos T Vδ1;

- desgranulación de linfocitos T Vδ1;

- aumento de la expresión de NCR;

- inmunomodulación de los linfocitos T Vδ1, por ejemplo, mediante la regulación descendente de la expresión en la superficie celular de TCR Vδ1, es decir, al causar la internalización de TCR Vδ1 o la expresión reducida de la proteína de TCR Vδ1, o al bloquear la fijación de TCR Vδ1; y/o

- regulación descendente de un complejo TCR/CD3.

A diferencia de los anticuerpos anti-Vδ1 del estado de la técnica que se enfocan en la disminución de linfocitos T Vδ1, los anticuerpos de la presente invención son útiles para la activación de linfocitos T Vδ1 a través del dominio de fijación a TRDV1. A pesar de que pueden causar regulación descendente de los TCR en linfocitos T a los que se fijan, no ocasionan disminución de linfocitos T Vδ1, sino que estimulan los linfocitos T y por lo tanto pueden ser útiles en entornos terapéuticos que podrían beneficiarse de la activación de este compartimento de linfocitos T. La activación de los linfocitos T Vδ1 es evidente a través de la regulación descendente de TCR, regulación descendente de CD3, cambios en los marcadores de activación tales como CD25 y Ki67, y marcador de desgranulación CD107a. A su vez, la activación de los linfocitos T Vδ1 activa la liberación de citocinas inflamatorias tales como INFɣ y TNFα para promover la licencia inmunitaria.

Medicamentos que modulan los marcadores de células inmunitarias en células Vδ1+

El anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este puede modular los marcadores de células inmunitarias en células Vδ1+ después de administrarlo a un paciente.

Un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este descrito en la presente también se puede evaluar para determinar su idoneidad para su uso terapéutico al medir la modulación de linfocitos T γδ. Por ejemplo, al medir un cambio en los niveles de CD25 o CD69 o CD107a presentes en un linfocito Vδ1+ o células en un sistema modelo. Tales marcadores se usan a menudo como marcadores de modulación (por ejemplo, proliferación o desgranulación) de linfocitos y se pueden medir después de aplicar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Sorprendentemente, durante tales evaluaciones (por ejemplo, ver, por ejemplo, los Ejemplos 7, 17, 18), se observó que los anticuerpos descritos en la presente confirieron niveles considerablemente

mayores de CD25 o CD69 o CD107a en los linfocitos T Vδ1+ diana. Opcionalmente, el cambio de fenotipo de una célula Vδ1+ o una población de estas células evaluado en el sistema modelo puede luego compararse con el cambio de fenotipo cuando se aplica un anticuerpo comparativo alternativo (por ejemplo, OKT-3, TS8.2, etc.) a dichos linfocitos T γδ equivalentes.

Por lo tanto, en un aspecto de la invención, se proporciona un método de evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ para uso terapéutico que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población celular que comprende células Vδ1+ y determinar el efecto sobre el nivel de CD25 y/o CD69 y/o CD107a sobre la superficie de las células Vδ1+. El efecto sobre el nivel de CD25, CD69 y/o CD107a se puede determinar/medir durante un período de tiempo. Se entenderá que el efecto se puede medir en comparación con el nivel de CD25 y/o CD69 y/o CD107a sobre la superficie de la célula Vδ1+ cuando dicho anticuerpo no se aplica a dicha célula durante el mismo período de tiempo. En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al agregar dichos anticuerpos a una población de células que comprende células Vδ1+ y luego medir el nivel (o la expresión) de CD25 o CD69 o CD107a sobre la superficie de dichas células Vδ1+.

Medicamentos que modulan las propiedades de crecimiento o las cantidades de células Vδ1+

El anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este puede modular las propiedades de crecimiento de células Vδ1+ después de administrarlo a un paciente. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este puede expandir células Vδ1+.

Un enfoque alternativo para medir la proliferación de T γδ puede incluir medir el cambio en la cantidad relativa de células Vδ1+ a lo largo del tiempo cuando se aplica un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente a sistemas modelo que contienen dichas células. Sorprendentemente, durante tales evaluaciones se observó que los anticuerpos como se describen en la presente fueron capaces de aumentar de manera mensurable la cantidad de dichos linfocitos T Vδ1+ (por ejemplo, ver, por ejemplo, los Ejemplos 10, 17 y 18). Opcionalmente, este cambio en la cantidad luego se puede comparar al cambio en la cantidad observada cuando se aplica un anticuerpo comparativo alternativo (por ejemplo, anti-OKT3) a dichos sistemas modelo.

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una

población celular que comprende células Vδ1+ y determinar el efecto sobre la cantidad de células Vδ1+ en la población. El efecto sobre la cantidad de células se puede determinar/medir durante un período de tiempo. Se entenderá que el efecto se puede medir en comparación con el efecto sobre las cantidades de células observadas cuando dicho anticuerpo no se aplica a la población celular durante el mismo período de tiempo. En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al aplicar dichos anticuerpos a una población celular que comprende células Vδ1 y luego medir la cantidad de dichas células a lo largo del tiempo.

Medicamentos que modulan la capacidad proliferativa y la cantidad de células Vδ1+

Un anticuerpo terapéutico ideal o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ puede ser uno que es capaz de mejorar la proliferación de células Vδ1+ *in vivo*. Luego, tales anticuerpos pueden emplearse como medicamentos diseñados para aumentar específicamente la cantidad de células Vδ1+ en un sujeto o paciente. Por ejemplo:

Cáncer:

Se han informado aumentos relativos en las cantidades de células Vδ1+ como un indicador de pronóstico positivo asociado con resultados mejorados para muchos tipos de cáncer (por ejemplo, ver Gentles *et al.* (2015) Nature Immunology 21: 938-945; Wu *et al*. (2019) Sci. Trans. Med. 11(513): eaax9364; Catellani *et al*. (2007) Blood 109(5): 2078-2085). En una forma de realización, se presenta en la presente un medicamento capaz de aumentar la cantidad relativa o absoluta de células Vδ1+ *in situ* en un paciente con cáncer.

Infecciones patógenas/parasitarias/virales:

Se observa el enriquecimiento de células Vδ1+ durante la defensa del huésped contra las numerosas infecciones patógenas/parasitarias/virales. Se puede encontrar una reseña general reciente en Zhao *et al.* (2018) Immunol. Res. 2018:5081634. Además, las cantidades aumentadas de Vδ1+ también se consideran una protección contra diversas infecciones virales de ADN y ARN. Por ejemplo, las cantidades aumentadas también se consideran protectoras durante las infecciones de CMV asociadas con trasplantes alogénicos (ver van Dorp *et al*. (2011) Biology of Blood and Marrow Transplantation 17(2): S217). Además, las cantidades de células Vδ+ aumentan en pacientes con infección de coronavirus (Poccia *et al*. (2006) J. Infect. Dis. 193(9): 1244-1249).

En otra forma de realización, se presenta en la presente un medicamento capaz de aumentar las cantidades relativas o absolutas de células Vδ1+ en un sujeto o paciente que tiene una infección patógena.

Trasplante de células madre:

Las mayores cantidades de células Vδ1+ también se han asociado con menos recidiva de la enfermedad, menos infecciones virales, mayor supervivencia general y libre de la enfermedad y resultados clínicos favorables en general durante el trasplante de células madre hematopoyéticas (por ejemplo, ver Aruda *et al*. (2019) Blood 3(21): 3436–3448 y ver Godder *et al*. (2007) Bone Marrow Transplantation 39: 751-757). Por lo tanto, otra forma de realización presentada en la presente es un medicamento capaz de aumentar las cantidades relativas o absolutas de células Vδ1+ en un sujeto como parte de un régimen de tratamiento que respalda un trasplante de células madre.

En consecuencia, es altamente deseable un medicamento capaz de aumentar preferencial o específicamente las cantidades de células Vδ1+ *in-situ.*

Medicamentos que mantienen o inducen o aumentan la secreción de citocinas de células Vδ1+

Las citocinas son un gran grupo de proteínas, péptidos o glicoproteínas segregadas por células específicas del sistema inmunitario. Son una categoría de moléculas de señalización que median y regulan la inmunidad, inflamación y hematopoyesis. Se ha implicado una cantidad de citocinas en mejorar los signos y síntomas de la enfermedad a través de modulación directa o indirecta del microentorno tumoral y celular, tejido autoinmunitario y microentorno asociado, o tejido infectado viralmente o entorno celular. Las citocinas proinflamatorias de ejemplo incluyen factor de necrosis tumoral-alfa (TNFα) e interferón-gamma (IFNγ).

Sin embargo, muchas de estas citocinas exhiben toxicidad desfavorable cuando se dosifica de manera sistémica. Por ejemplo, si bien TNFα puede inducir la necrosis hemorrágica de los tumores trasplantados, y se informó que produce efectos antitumorales sinérgicos cuando se combina con otros fármacos quimioterapéuticos, diversos ensayos clínicos con TNFα humano recombinante (rhTNFα) sistémico resaltaron significativos efectos secundarios que limitan la dosis, incluso hipotensión, escalofríos, flebitis, trombocitopenia, leucopenia y hepatotoxicidad, fiebre, fatiga, náuseas/vómitos, malestar general y debilidad, cefalea, opresión en el pecho, dolor en la espalda baja, diarrea y disnea.

El uso de IFNγ recombinante también enfrenta desafíos similares de toxicidad sistémica. Por ejemplo, si bien IFNγ puede producir, en un entorno de cáncer, efectos pleiotrópicos favorables, incluso regulación ascendente de MHC clase I y II para estimular la actividad antitumoral, aumento de la infiltración de linfocitos T, generación de efectos antiangiogénesis, inducción de secreción de quimiocinas/citocinas y generación de efectos directos en contra de la proliferación de células cancerosas, también se observan efectos secundarios adversos. Estos incluyen fiebre, cefalea, escalofríos, fatiga, diarrea, náuseas, vómitos, anorexia, aumentos transitorios en la transaminasa hepática y disminuciones transitorias en recuentos de granulocitos

y leucocitos.

Se puede encontrar una reseña reciente del potencial y las limitaciones de TNFα e IFNγ recombinantes sistémicos en Shen *et al*. (2018) Cell Prolif. 51(4): e12441.

Por lo tanto, se necesita una producción de tales citocinas más específica de tejido o célula, más controlada *in situ* y más localizada. Por ejemplo, se propone una expresión o inducción más controlada de citocinas proinflamatorias como un enfoque mediante el cual los tumores "fríos" se pueden volver "calientes". Los tumores calientes también se denominan a veces "con inflamación de linfocitos T" debido a que también se observa un aumento de la cantidad o densidad de linfocitos T CD45+. Ver Bonaventura *et al*. (2019) Front. Immunol. 10: 168 para obtener una reseña reciente.

Por tales razones, un anticuerpo terapéutico ideal o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ puede ser uno que pueda mantener o mejorar o inducir la secreción de citocinas en células Vδ1+ *in vivo*. Luego, tales anticuerpos pueden emplearse como medicamentos diseñados para inducir o aumentar específicamente las citocinas en un sujeto o paciente y de una manera más localizada y menos sistémica que se correlaciona de mejor manera con la distribución de células Vδ1+ en dicho sujeto o paciente.

Notablemente, cuando los anticuerpos descritos en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ se aplican a células Vδ1+, se observa un nivel significativamente mayor de citocinas segregadas. Más específicamente, y como un ejemplo no limitativo, se observa un nivel significativamente más alto de TNFα e IFNγ. Ver, por ejemplo, el Ejemplo 15.

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población celular que comprende células Vδ1+ y determinar la cantidad de al menos una citocina producida por la población celular. La cantidad de citocina producida se puede determinar/medir durante un período de tiempo y opcionalmente se compara con la cantidad observada cuando dicho anticuerpo no se aplica a la población celular durante el mismo período de tiempo. En una forma de realización, el nivel observado de citocina producido cuando el anticuerpo se administra a la población celular es más de alrededor de 10 %, más de alrededor de 20 %, más de alrededor de 30 %, más de alrededor de 50 %, más de alrededor de 100 %, más de alrededor de 150 %, más de alrededor de 200 %, más de alrededor de 250 %, más de alrededor de 300 %, más de alrededor de 350 %, más de alrededor de 400 %, más de alrededor de 450 %, más de alrededor de 500 %, más de alrededor de 1000 %, con respecto al nivel de citocina producido cuando no se aplica el anticuerpo. En un aspecto adicional de la invención, la citocina es una citocina

proinflamatoria. En un aspecto adicional de la invención, la citocina es una citocina TNF-α. En un aspecto adicional de la invención, es citocina IFN-γ.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al aplicar dichos anticuerpos a una población celular que comprende células Vδ1 y luego al medir el nivel de al menos una citocina generada. En un aspecto adicional de la invención, la citocina medida es una citocina TNF-α y/o citocina IFN-γ.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al aplicar dicho anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población celular que comprende células Vδ1+ y medir el efecto del anticuerpo sobre la modulación de un tumor más frío o frío para que se convierta en un tumor más caliente o caliente al determinar la cantidad de citocinas proinflamatorias producidas y/o la cantidad o densidad de linfocitos T CD45+ en el tumor o microentorno tumoral.

Medicamentos que mantienen o inducen o aumentan la actividad de granzima B de las células Vδ1+

La granzima B es una serina proteasa que se encuentran habitualmente en los gránulos de las células *natural killer* (células NK) y los linfocitos T citotóxicos. Estas células la segregan junto con la perforina de proteína formadora de poros para mediar la apoptosis en las células diana, tales como células enfermas.

Cuando las células Vδ1+ se incuban en cocultivos con células enfermas diana (tales como células cancerosas) en sistemas modelo, los niveles y la actividad de granzima B pueden medirse en las células enfermas diana antes de la lisis. Notablemente, cuando un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ se aplica luego a tales cocultivos de células Vδ1+ y células cancerosas en tales sistemas modelo, se observan mayores niveles y actividad de granzima B en las células cancerosas enfermas antes de la muerte celular (ver, por ejemplo, el Ejemplo 16).

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a un cocultivo que comprende células Vδ1+ y células enfermas (tales como células cancerosas) y medir el efecto sobre la cantidad de granzima B producida por las células enfermas en el cocultivo. La cantidad de citocina producida se puede determinar/medir durante un período de tiempo y se compara opcionalmente con la cantidad observada cuando dicho anticuerpo no se aplica a dicho cocultivo

durante el mismo período de tiempo. En una forma de realización, el nivel de granzima B medido cuando dicho anticuerpo se aplica a dicho cocultivo es más de alrededor de 10 %, más de alrededor de 20 %, más de alrededor de 30 %, más de alrededor de 40 %, más de alrededor de 50 %, más de alrededor de 70 %, más de alrededor de 80 %, más de alrededor de 90 %, más de alrededor de 100 %, más de alrededor de 200 %, con respecto al nivel de granzima B observado cuando no se aplica dicho anticuerpo.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al aplicar dichos anticuerpos a un cocultivo que comprende células Vδ1+ y células enfermas y luego medir la cantidad o actividad de granzima B en la célula enferma.

Medicamentos que expanden las poblaciones de células Vδ1+ policlonales

Un medicamento de anticuerpo ideal también puede ser uno diseñado para garantizar que las células Vδ1+ en expansión no se enfoquen demasiado en términos de clonación en el nivel de la secuencia de CDR3 hipervariable. Por lo tanto, se puede diseñar un medicamento de anticuerpo ideal para evitar inducir la proliferación de células Vδ1+ mediante la fijación a parátopos de secuencia de CDR3 δ1+ específicos o "privados". En su lugar, el anticuerpo puede fijarse a través de secuencias de la línea germinal conservadas presentes en todos los receptores de linfocitos T Vδ1+ y de manera independiente de la cadena gamma, en lugar de fijarse a secuencias que se presentan solo en un subconjunto de células Vδ1+.

Por lo tanto, un medicamento de anticuerpo ideal puede estimular la expansión de células Vδ1+ para generar una pluralidad de células Vδ1+ que contienen una mezcla de secuencias de CDR3. Esto a su vez daría como resultado una población policlonal heterogénea expandida *in vivo* de células Vδ1+ que presentan diferentes secuencias de CDR3 en las cadenas variables delta 1. Notablemente, durante el análisis de las poblaciones de células Vδ1+ expandidas generadas con un método para agregar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente a una población inicial de células inmunitarias que contienen células Vδ1+, se observa policlonalidad extensa mediante metodologías a base de ARNseq diseñadas para secuenciar a través de las regiones hipervariables de CDR3 del ARN extraído (ver, por ejemplo, el Ejemplo 10).

En consecuencia, en un aspecto se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población celular que comprende células Vδ1+ y determinar la policlonalidad de las células Vδ1+ expandidas. Es conveniente que un medicamento de anticuerpo genere una población policlonal

expandida que contiene una pluralidad de secuencias de CDR3 Vδ1+. La policlonalidad se puede determinar con métodos conocidos en la técnica, tales como enfoques de secuenciación de ácido nucleico capaces de analizar el contenido de CDR3 hipervariable de cadena Vδ1 de dichas células Vδ1+.

Medicamentos que expanden las células Vδ1+ policlonales durante períodos extendidos de tiempo

Un medicamento de anticuerpo ideal puede ser capaz de mejorar o promover o estimular la proliferación de células Vδ1+ primarias sin agotar tales células *in vivo*. Por ejemplo, y a modo de comparación, los medicamentos anti-CD3, tales como OKT3 (por ejemplo, muronomab), si bien son capaces de expandir los linfocitos T CD3 positivos, también pueden agotar o inducir la anergia. Para evaluar la capacidad de los anticuerpos descritos en la presente y que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ para impulsar la división celular continua de las células Vδ1+ viables, se realizaron estudios de proliferación a mayor plazo. Notablemente, estos estudios revelaron que los anticuerpos descritos en la presente y que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ son capaces de impulsar la división/proliferación celular de células Vδ1+ viables y aún funcionalmente citotóxicas durante más de 40 días (ver, por ejemplo, el Ejemplo 10).

En una forma de realización, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende aplicar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población celular y monitorear el período de tiempo durante el cual se produce la división de las células Vδ1+. Idealmente, el anticuerpo es capaz de estimular la división de células Vδ1+ durante un período de 5 a 60 días, tal como al menos de 7 a 45 días, de 7 a 21 días o de 7 a 18 días.

En una forma de realización adicional, se proporciona un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ y que, cuando se administra a un paciente, puede estimular la división de células Vδ1+ para aumentar la cantidad al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces, al menos 300 veces, al menos 400 veces, al menos 500 veces, 600 veces o al menos 1.000 veces.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al aplicar dichos anticuerpos a células Vδ1+ o una población de células mixtas que contiene células Vδ1 y luego medir la cantidad de células Vδ1+ a lo largo del tiempo.

Medicamentos que modulan las células inmunitarias no Vδ1+ a través del

direccionamiento a células inmunitarias Vδ1+

Un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente también se puede evaluar al medir la modulación mediada por células Vδ1+ de otras células inmunitarias. Por ejemplo, un cambio observado en una "fracción" de linfocito T no γδ se puede medir después de la aplicación de un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente a un sistema modelo que comprende una población mixta de células inmunitarias, tal como una que comprende células αβ de tejido humano y linfocitos T γδ. Además, el efecto de tipos de célula no γδ en dichos modelos se puede medir mediante citometría de flujo. Por ejemplo, al medir el cambio relativo en la cantidad de linfocitos T αβ CD8+ tras la adición de un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente a cultivos mixtos que comprenden linfocitos T γδ y linfocitos T noγδ. Opcionalmente, el cambio observado en la cantidad o fenotipo de una población de linfocitos CD8+ linfocitos T no γδ luego se puede comparar al cambio en la cantidad cuando se aplica un anticuerpo comparativo alternativo (por ejemplo, OKT-3) a dicha población mixta.

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población mixta de células inmunitarias o tejidos que comprenden células Vδ1+ y células inmunitarias Vδ1 negativas y medir el efecto sobre las células inmunitarias Vδ1 negativas. El efecto se puede determinar/medir durante un período de tiempo y comparar opcionalmente con el efecto observado en células Vδ1 negativas cuando no se aplica dicho anticuerpo durante el mismo período de tiempo. El efecto se puede medir como un cambio en la cantidad de células inmunitarias Vδ1 negativas. Por ejemplo, el anticuerpo puede aumentar la cantidad de células inmunitarias Vδ1 negativas en más de alrededor de 10 %, más de alrededor de 20 %, más de alrededor de 30 %, más de alrededor de 40 %, más de alrededor de 50 %, más de alrededor de 70 %, más de alrededor de 80 %, más de alrededor de 90 %, más de alrededor de 100 %, más de alrededor de 500 %, con respecto a los niveles observados cuando no se aplica dicho anticuerpo.

En un aspecto adicional de la invención, la célula Vδ1-negativa modulada es una célula CD45+. En un aspecto adicional de la invención, la célula modulada es un linfocito T αβ. En un aspecto adicional de la invención, la célula αβ+ es un linfocito CD8+. En un aspecto adicional de la invención, el linfocito T αβ modulado, o la población de este, exhibe evidencia de división celular mejorada. En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmento de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al administrar dichos anticuerpos a una población de células inmunitarias mixtas que comprenden células Vδ1+ y

células inmunitarias Vδ1 negativas y luego medir un efecto conferido sobre la población de células Vδ1 negativas por las células Vδ1+ moduladas por dichos anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos.

Opcionalmente, y durante la "modulación del sistema inmunitario mediada por células Vδ1+" como se confiere mediante un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente, también se observa un aumento concomitante en la cantidad de células Vδ1+. Sin limitarse a esta teoría, es posible que dicho aumento en la cantidad de células Vδ1+ pueda ser causal de impulsar la expansión concomitante de las células inmunitarias Vδ1 negativas copresentes, tales como linfocitos T αβ. Una hipótesis alternativa puede ser que las secreciones de citocinas inducidas por anticuerpos de los linfocitos T Vδ1+ estimulan la expansión de células inmunitarias Vδ1 negativas.

En un aspecto adicional de la invención, el aumento observado en la población de linfocitos αβ+ CD8+ se compara con un anticuerpo comparativo tal como el anticuerpo OKT3 o el anticuerpo anti-Vδ1 alternativo. En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al anticuerpo de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al aplicar dichos anticuerpos a una población de células inmunitarias mixtas que comprenden linfocitos T Vδ1+ y linfocitos T αβ y luego medir las cantidades de linfocitos T αβ CD8++ a lo largo del tiempo.

Medicamentos que modulan los linfocitos que infiltran tumores (TIL)

Un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente también se puede evaluar al medir el efecto conferido sobre las poblaciones que infiltran tumores (TIL) en sistemas modelo. Sorprendentemente (ver, por ejemplo, el Ejemplo 18), durante tales evaluaciones, los anticuerpos como se describen en la presente modularon de manera mensurable las poblaciones de TIL en tumores humanos. Por ejemplo, un cambio en la cantidad o el fenotipo de población de TIL de linfocitos γδ+ o la población de TIL de linfocitos no γδ se mide después de la aplicación de un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente a un tumor humano tal como un carcinoma de células renales humano. Opcionalmente, el cambio observado en la cantidad o el fenotipo de una población de TIL de linfocitos γδ+ o una población de TIL de linfocitos no γδ luego se puede comparar con el cambio observado cuando se aplica un anticuerpo comparativo alternativo (por ejemplo, OKT-3) a dicho sistema modelo.

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a los TIL ubicados en, o derivados de, un tumor humano y determinar el efecto sobre la cantidad de TIL. El efecto se puede determinar/medir durante un período de tiempo y comparar opcionalmente con la

cantidad de TIL observada cuando dicho anticuerpo no se aplica durante el mismo período de tiempo. El efecto puede ser un aumento en la cantidad de TIL. Por ejemplo, el anticuerpo puede aumentar la cantidad de TIL en más de alrededor de 10 %, más de alrededor de 20 %, más de alrededor de 30 %, más de alrededor de 40 %, más de alrededor de 50 %, más de alrededor de 70 %, más de alrededor de 80 %, más de alrededor de 90 %, más de alrededor de 100 % con respecto a las cantidades de TIL observadas cuando no se aplica dicho anticuerpo. En un aspecto adicional, los TIL en los que la cantidad observada son células de TIL de linfocitos γδ+ y/o células de TIL de linfocitos no γδ.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de anticuerpos contra células TCR γδ al aplicar dichos anticuerpos al TIL o los TIL ubicados en o derivados de un tumor humano y luego medir el cambio en la cantidad de TIL o células de TIL a lo largo del tiempo.

Medicamentos que modulan la citotoxicidad de Vδ1+ humana

Un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente también se puede evaluar al medir el efecto conferido sobre la citotoxicidad mediada por células Vδ1+. Sorprendentemente, durante tales evaluaciones de anticuerpos como se describen en la presente (ver, por ejemplo, Ejemplos 19 y 27) se observó citotoxicidad mediada por células Vδ1+ mejorada de manera mensurable. Por ejemplo, se observa una reducción en la cantidad de células cancerosas o un aumento en la cantidad de células cancerosas inactivadas después de la aplicación de un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a un sistema modelo que comprende un cultivo mixto que comprende células Vδ1+ y dichas células cancerosas. Opcionalmente, la reducción en la cantidad de células cancerosas o el aumento en la cantidad de células cancerosas inactivadas luego se puede comparar con el resultado cuando se aplica un anticuerpo comparativo alternativo (por ejemplo, OKT-3) a dichos sistemas modelos.

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende aplicar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población mixta de células que comprenden células Vδ1+ y células cancerosas y medir la citotoxicidad de las células Vδ1+ hacia las células cancerosas. La citotoxicidad se puede medir mediante un aumento en la cantidad de células cancerosas muertas durante un período de tiempo y opcionalmente en comparación con la cantidad de células cancerosas muertas observada cuando no se aplica dicho anticuerpo a la población mixta de células durante el mismo período de tiempo. Por ejemplo, el aumento observado en las células muertas cuando se aplica dicho anticuerpo puede ser más de alrededor de 10 %, más de alrededor de 20 %, más de alrededor de 30 %, más de alrededor de

40 %, más de alrededor de 50 %, más de alrededor de 70 %, más de alrededor de 80 %, más de alrededor de 90 %, más de alrededor de 100 %, más de alrededor de 200 %, más de alrededor de 500 %, con respecto a la cantidad de células muertas observadas cuando no se aplica dicho anticuerpo.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de células TCR γδ al agregar dichos anticuerpos a dicha población de células inmunitarias mixtas que comprenden células Vδ1+ humanas y células cancerosas y luego medir un aumento en las células cancerosas muertas en el tiempo.

Medicamentos que modulan las relaciones de células diana Vδ1+ con respecto a células efectoras (relaciones T:E)

Un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente también puede evaluarse al medir cómo dichos anticuerpos mejoran la citotoxicidad de células cancerosas mediadas por Vδ1+ al determinar la relación de células diana con respecto a células efectoras en donde 50 % de las células diana (EC50) están inactivadas en un sistema modelo para evaluar dichos anticuerpos como medicamentos potenciales. Por ejemplo, los cultivos mixtos que comprenden células cancerosas diana con células efectoras Vδ1+ humanas. Sorprendentemente, durante tales evaluaciones (por ejemplo, ver el Ejemplo 19), los anticuerpos como se describen en la presente modifican favorablemente la relación T:E de EC50 en sistemas modelo. Tales modificaciones pueden medirse como cantidades de células Vδ1+ requeridas para observar 50 % de inactivación de células cancerosas durante un tiempo establecido. Esto también puede informarse como cambio o como mejoras en veces o como mejoras en porcentaje en la citotoxicidad hacia dichas células cancerosas. Opcionalmente, la relación T:E conferida por los anticuerpos de la presente invención luego se pueden comparar con las relaciones T:E cuando se aplica un anticuerpo comparativo alternativo (por ejemplo, OKT-3) a dichos sistemas modelo. En algunos escenarios, los anticuerpos multiespecíficos de la invención presentan oportunidades para la citotoxicidad de células cancerosas mejorada incluso en las relaciones E:T más bajas, en comparación con los anticuerpos monoespecíficos.

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende aplicar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población mixta de células que comprenden células Vδ1+ humanas y células cancerosas y medir la cantidad de células Vδ1+ requeridas para inactivar 50 % de las células cancerosas. Esto se puede medir con respecto a la cantidad de células Vδ1+ requeridas para inactivar 50 % de las células

cancerosas sin la aplicación de dicho anticuerpo, opcionalmente durante el mismo período de tiempo. Por ejemplo, la reducción en la cantidad de células Vδ1+ requeridas para inactivar 50 % de las células cancerosas cuando se aplica dicho anticuerpo puede ser mayor de alrededor de 10 %, mayor de alrededor de 20 %, mayor de alrededor de 30 %, mayor de alrededor de 40 %, mayor de alrededor de 50 %, mayor de alrededor de 70 %, mayor de alrededor de 80 %, mayor de alrededor de 90 %, mayor de alrededor de 100 %, mayor de alrededor de 200 %, mayor de alrededor de 500 %, con respecto a la cantidad de células Vδ1+ requeridas para inactivar 50 % de las células cancerosas cuando no se aplica dicho anticuerpo.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 al agregar dichos anticuerpos a dicha población de células que comprenden células Vδ1+ más células cancerosas y luego medir las cantidades de células Vδ1+ requeridas para inactivar 50 % de las células cancerosas.

Medicamentos que mejoran la citotoxicidad de EC50 de células Vδ1+

Una manera alternativa para medir la citotoxicidad mejorada de las células Vδ1+ humanas o población de estas es medir la cantidad de células requeridas para inactivar 50 % de las células cancerosas durante un período de tiempo establecido en condición A (tal como control de inicio) y comparar esto a la cantidad de células requeridas para inactivar 50 % de las células cancerosas durante un período de tiempo establecido en condición B (tal como tras la aplicación del anticuerpo de la invención como se describe en la presente).

Si bien se reconoce que hay una variedad de maneras para medir tales parámetros, para ayudar a comprender, se detallará el siguiente ejemplo hipotético no limitativo:

Hipotéticamente, la mejora en la citotoxicidad de células efectoras puede medirse de la siguiente manera: En la condición A (tratamiento de control) se observa que se requieren 1000 células Vδ1+ para inactivar 50 % de las células cancerosas durante un período de tiempo establecido (por ejemplo, 5 horas). En la condición B (por ejemplo, la aplicación del anticuerpo de la invención que se describe en la presente) se observa que se requirieron 500 células Vδ1+ para inactivar 50 % de las células cancerosas durante el mismo período de tiempo. Por lo tanto, en este ejemplo, la aplicación de un anticuerpo mejoró la citotoxicidad de la población de células Vδ1+ en 200 %:

(1000/500) x 100= 200 %

Por ejemplo (por ejemplo, ver Ejemplos 19 a 21), sorprendentemente, se observaron tales mejoras de porcentaje para los anticuerpos multiespecíficos de la invención como se describe en la presente.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o

caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ al agregar dichos anticuerpos a dicha población de células inmunitarias mixtas que comprenden células Vδ1+ y células cancerosas y determinar el cambio relativo o en porcentaje de la citotoxicidad en comparación con un experimento de control o equivalente en donde no hay aplicación de dicho anticuerpo a dicha mezcla de células.

Medicamentos que mejoran la especificidad de células enfermas de células Vδ1+ mientras preservan las células sanas.

Otro enfoque para evaluar los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente es medir cómo dichos anticuerpos modulan la citotoxicidad específica de células enfermas. Sorprendentemente durante tales estudios, se descubrió que tales anticuerpos pueden mejorar específicamente la inactivación específica de células Vδ1+ de células enfermas tales como células cancerosas (por ejemplo, ver los Ejemplos 19 y 27) mientras preservan las células sanas o no enfermas. Los medicamentos de anticuerpos ideales que se administran a un paciente para mejorar un síntoma de cáncer conferirán citotoxicidad mejorada específicamente hacia las células enfermas mientras preservan las células sanas. Y se puede decir que los medicamentos que mejoran la citotoxicidad de células efectoras específicamente hacia células enfermas, tales como células cancerosas, exhiben un índice terapéutico mejorado (TI) sobre medicamentos que no mejoran selectivamente la citotoxicidad de células efectoras específicamente hacia dichas células enfermas. El índice terapéutico también se denomina relación terapéutica y es una medición cuantitativa de la seguridad relativa de un fármaco. Es una comparación de la cantidad de un agente terapéutico que produce el efecto terapéutico con respecto a la cantidad que causa toxicidad, por ejemplo, al conferir la muerte no deseada en poblaciones de células sanas relacionadas o relevantes. Un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este como se describe en la presente se puede evaluar al medir su capacidad de cambiar o mejorar, o mejorar en veces la capacidad de células Vδ1+ para inactivar selectivamente las células enfermas más allá de las células sanas en sistemas modelo. Por ejemplo, dichos sistemas modelo pueden comprender células efectoras Vδ1+, células cancerosas y células de control (tales como células sanas). Opcionalmente, la mejora en veces de la inactivación selectiva de células enfermas conferida por los anticuerpos multiespecíficos de la invención luego se puede comparar con la mejora en veces observada cuando se aplica un anticuerpo comparativo alternativo (por ejemplo, OKT-3) a dichos sistemas modelo.

La especificidad de células enfermas y la mejora en la especificidad de células enfermas de las células Vδ1+ se pueden medir en cultivos que comprenden células Vδ1+, células enfermas y células sanas. Por ejemplo, la especificidad de Vδ1+ hacia las células enfermas se puede medir al

observar la cantidad de células cancerosas inactivadas por las células Vδ1+ y luego comparar la cantidad de células sanas inactivadas por las células Vδ1+. Tales comparaciones se pueden controlar al incluir cantidades equivalentes de las células enfermas y células sanas en un sistema modelo que también contiene células Vδ1+, por ejemplo, "tricultivos". También puede considerarse otra metodología de comparación alternativa, por ejemplo, cuando las limitaciones analíticas o de equipo reducen la capacidad de distinguir y monitorear todos los tres tipos de célula o más en paralelo en un ensayo único (que incluye las células Vδ1+, células enfermas y células no enfermas). En dichas instancias, al comparar la citotoxicidad de células Vδ1+ hacia las células enfermas en un experimento y luego al comparar la citotoxicidad de células Vδ1+ hacia las células sanas en un experimento equivalente separado se ofrece un enfoque alternativo a tales estudios.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la cadena Vδ1 de un TCR γδ que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este a una población de células que comprende células Vδ1+ y células diana y medir la especificidad citotóxica de las células hacia las células diana. En una forma de realización, la especificidad de citotoxicidad de células a un primer tipo de célula diana se puede comparar a la citotoxicidad observada hacia un segundo tipo de célula diana, por lo tanto, el método puede repetirse mediante el uso de diferentes tipos de célula diana. En un aspecto adicional de la invención, el primer tipo de célula diana es una célula enferma y el segundo tipo de célula diana es una célula de control tal como una célula sana o una célula con una enfermedad diferente al primer tipo de célula diana.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para seleccionar o caracterizar o comparar anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos como se describen en la presente que se fijan a la cadena Vδ1 de un TCR γδ, en donde se mide y se compara el efecto conferido por dicho anticuerpo sobre la citotoxicidad de células Vδ1+ hacia (i) un primer tipo de célula y (ii) un segundo tipo de célula. En un aspecto adicional de la invención se selecciona así un anticuerpo que mejora la citotoxicidad específica hacia el primer tipo de célula más que hacia el segundo tipo de célula. En un aspecto adicional de la invención, el primer tipo de célula es una célula enferma y el segundo tipo de célula es una célula sana.

Como se describe en la presente, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos usados en los ensayos pueden presentarse en una superficie, por ejemplo, la superficie de una célula, tal como una célula que comprende un receptor Fc. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden presentarse en la superficie de las células THP-1, tales como las células TIB-202™ (disponibles a través de American Type Culture Collection (ATCC)). Alternativamente, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de fijación al antígeno de estos pueden usarse directamente en los ensayos.

En tales ensayos funcionales, la producción puede medirse al calcular la mitad de la concentración máxima, también denominada "EC50" o "concentración eficaz a 50 por ciento". El término "IC50" se refiere a la concentración inhibitoria. Tanto EC50 como IC50 pueden medirse con métodos conocidos en la técnica, tales como métodos de citometría de flujo. En algunos casos, EC50 y IC50 son el mismo valor o pueden considerarse equivalentes. Por ejemplo, la concentración eficaz (EC) de las células efectoras requeridas para inhibir (por ejemplo, inactivar) 50 % de un cierto tipo de célula también puede considerarse el 50 % de la concentración inhibitoria (IC). Para evitar dudas, los valores de EC50 en la presente solicitud se proporcionan mediante el uso del anticuerpo con formato IgG1 cuando se refiere a un anticuerpo. Tales valores se pueden convertir fácilmente en función del peso molecular del formato de anticuerpo para los valores equivalentes de la siguiente manera:

(µg/ml) / (MW en kDa) = µM

La EC50 para la regulación descendente del TCR γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento) para los clones parentales que se describen en la presente puede ser menor de 0,50 µg/ml, tal como menor de 0,40 µg/ml, 0,30 µg/ml, 0,20 µg/ml, 0,15 µg/ml, 0,10 µg/ml, 0,06 µg/ml o 0,05 µg/ml. En una forma de realización preferida, la EC50 para la regulación descendente del TCR γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento) es menor de 0,10 µg/ml. En particular, la EC50 para la regulación descendente del TCR γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento) puede ser menor de 0,06 µg/ml, tal como menor de 0,05 µg/ml, 0,04 µg/ml o 0,03 µg/ml. En particular, dichos valores de EC50 son cuando el anticuerpo se mide en un formato IgG1. Por ejemplo, el valor de EC50 para la regulación descendente de TCR γδ se puede medir mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en el ensayo del Ejemplo 6 y 27).

En particular, la EC50 para la desgranulación de linfocitos T γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento) puede ser menor de 0,050 µg/ml, tal como menor de 0,040 µg/ml, 0,030 µg/ml, 0,020 µg/ml, 0,015 µg/ml, 0,010 µg/ml o 0,008 µg/ml. En particular, la EC50 para la desgranulación de linfocitos T γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento) puede ser menor de 0,005 µg/ml, tal como menor de 0,002 µg/ml. En una forma de realización preferida, la EC50 para la desgranulación de linfocitos T γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento) es menor de 0,007 µg/ml. En particular, dichos valores de EC50 son cuando el anticuerpo se mide en un formato IgG1. Por ejemplo, el valor de EC50 para la desgranulación de linfocitos T γδ se puede medir al detectar la expresión CD107a (es decir, un marcador de desgranulación de células) mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en el ensayo del Ejemplo 7). En una forma de realización, la expresión de CD107a se mide con un anticuerpo anti-CD107a, tal como anti-CD107a BV421 humano (clon H4A3) (BD Biosciences).

La EC50 para la inactivación de linfocitos T γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento)

puede ser menor de 0,50 µg/ml, tal como menor de 0,40 µg/ml, 0,30 µg/ml, 0,20 µg/ml, 0,15 µg/ml, 0,10 µg/ml o 0,07 µg/ml. En una forma de realización preferida, la EC50 para la inactivación de linfocitos T γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento) es menor de 0,10 µg/ml. En particular, la EC50 para la inactivación de linfocitos T γδ tras la fijación del anticuerpo (o fragmento) puede ser menor de 0,060 µg/ml, tal como menor de 0,055 µg/ml, en particular menor de 0,020 µg/ml. En particular, dichos valores de EC50 son cuando el anticuerpo se mide en un formato IgG1. Por ejemplo, el valor de inactivación de linfocitos T γδ de EC50 se puede medir al detectar la proporción de células muertas (es decir, con un colorante de viabilidad celular) mediante el uso de citometría de flujo después de la incubación del anticuerpo, linfocito T γδ y células diana (por ejemplo, como se describe en el ensayo del Ejemplo 8). En una forma de realización, la muerte de la célula diana se mide con un colorante de viabilidad celular que es Viability Dye eFluor™ 520 (ThermoFisher).

En los ensayos descritos en estos aspectos, el anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno de este puede presentarse en la superficie de una célula, tal como una célula THP-1, por ejemplo, TIB-202™ (ATCC). Las células THP-1 se etiquetan opcionalmente con un tinte, tal como CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher).

Medicamentos que regulan de manera descendente las moléculas de CD3 asociadas con un TCR Vδ1.

En la presente se presentan anticuerpos que acoplan el complejo de linfocitos T/CD3 de manera diferencial. Específicamente, estos anticuerpos pueden acoplarse a través del dominio de TRDV1 de los TCR Vδ1 expresados solo en células Vδ1+. De este modo, tales medicamentos funcionan de manera diferencial. A su vez, este evento de acoplamiento puede regular de manera descendente los complejos de moléculas de CD3 asociados a TCR. Tal regulación descendente de CD3 puede ser sinónimo de activación de linfocitos T. Sin embargo, al acoplar el complejo de linfocitos T/CD3 a través del dominio de TRDV1 de esta manera, solo las moléculas CDR3 asociadas con el TCR Vδ1 están reguladas de manera descendente. Este mecanismo se muestra claramente en la Figura 29.

Por lo tanto, en una forma de realización, se proporciona un método para regular de manera descendente un TCR Vδ1 que contiene TRDV1 y el complejo de moléculas CD3 asociado en la superficie de una célula con un anticuerpo, y el uso de tales anticuerpos para este propósito.

En algunas formas de realización, también se presentan en la presente TCE multiespecíficos que pueden acoplar el complejo de linfocitos T/CD3 a través del dominio de TRDV1. Los medicamentos actuales multiespecíficos con formato TCE suelen acoplar y activar un linfocito T a través de eventos de fijación a CD3. Esto puede dar como resultado la regulación descendente de complejos de moléculas CD3 de la superficie de un linfocito T. Sin embargo,

también se entiende bien que los TCE también puede sobreestimular linfocitos T a través de tal acoplamiento y regulación descendente. Los complejos de moléculas CD3 no son específicos a una clase de linfocitos T y por lo tanto no son una diana precisa a la que dirigirse. La estimulación de todos los linfocitos T (principalmente el subtipo αß) a través de CD3 a su vez puede dar como resultado la sobreproducción de citocinas, lo que conduce a brotes agudos de citocina (las denominadas tormentas de citocinas). Además, en los enfoques no dirigidos que acoplan y activan todos los linfocitos T a través de CD3, paradójicamente los linfocitos T pueden volverse sobreactivados lo que conduce al agotamiento de linfocitos T y/o muerte de linfocitos T. En efecto, esta activación de linfocitos pan T no específicos conduce a la activación de linfocitos T efectores y reguladores mientras que el enfoque presentado en la presente interactúa específicamente con una población efectora. Por lo tanto, esta solución radical está lejos de ser ideal cuando se desea regular de manera ascendente solo los linfocitos T selectivos.

Por el contrario, en la presente se presentan anticuerpos multiespecíficos, en particular acopladores de linfocitos T, que acoplan el complejo de linfocitos T/CD3 de manera diferencial. Específicamente, estos TCE pueden acoplarse a través del dominio de TRDV1 de los TCR Vδ1 expresados solo en células Vδ1+. De este modo, tales medicamentos a base de TCE funcionan de manera diferencial. Primero, estos TCE pueden regular de manera descendente un TCR a través del acoplamiento de un epítopo de TRDV-1. A su vez, este evento de acoplamiento regula de manera descendente los complejos de moléculas CD3 asociados con TCR. Tal regulación descendente de CD3 puede ser sinónimo de activación de linfocitos T. Sin embargo, al acoplar el complejo de linfocitos T/CD3 a través del dominio de TRDV1 de esta manera, solo las moléculas CDR3 asociadas con el TCR Vδ1 están reguladas de manera descendente. Este enfoque de direccionamiento y activación de células Vδ1 específicos permite evitar muchos de los problemas anteriores (tormentas de citocinas, agotamiento/disminución de linfocitos T y ADCC, por ejemplo). Nuevamente, este mecanismo se muestra claramente en la Figura 29.

La estimulación de linfocitos T a través del enfoque radical de CD3 también puede contribuir a la disminución de linfocitos T a través de mecanismos impulsados por el receptor Fc gamma, tal como ADCC. Por lo tanto, la mayoría de los anticuerpos biespecíficos con direccionamiento de CD3 actualmente en la práctica clínica tienen dominios Fc con actividad reducida de fijación a FcγR o son fragmentos biespecíficos intencionalmente sin la región Fc. Los tratamientos de direccionamiento de CD3 también pueden tener afinidad de fijación reducida de los brazos de fijación del complejo receptor de linfocitos T.

Esta reducción en la afinidad puede dar como resultado una eficacia reducida y menos opcionalidad en términos de diseño y funcionalidad de TCE. Por ejemplo, se sabe que la afinidad de los dominios de fijación en tales TCE impulsa el perfil de distribución *in vivo*. Específicamente,

se suele observar que la distribución de TCE está sesgada hacia su diana de mayor afinidad. Por lo tanto, al reducir la afinidad de un dominio de fijación a TCE al complejo de linfocitos T, se suele sesgar luego la distribución fuera de los linfocitos T; los mismos linfocitos necesarios para impulsar la eficacia en tales TCE. En parte es por dichas razones que las ventanas terapéuticas de TCE se denominaron "prohibitivamente estrechas". El enfoque que se presenta aquí se dirige y activa específicamente células vδ1, lo que evita la necesidad de eliminar la función Fc o reducir la afinidad. Esto se muestra, por ejemplo, en la Figura 37 y el Ejemplo 15, que demuestra el potencial para reducir adicionalmente las toxicidades cutáneas limitativas de la dosis en comparación con variantes de EGFR con mayor afinidad de la presente invención, por ejemplo.

Además, en el enfoque presentado en la presente, los anticuerpos se acoplan en el TCR de células vδ1, pero no se produce una activación completa a menos que también haya células tumorales. Un acoplamiento completo de los anticuerpos presentados en la presente en el TCR conduce a una regulación descendente parcial y las células vδ1 fijadas a los anticuerpos presentados en la presente solo se activan por completo y se vuelven citotóxicas en el microentorno tumoral. Esto representa otra ventaja de seguridad vital para el enfoque presente, ya que se reduce la citotoxicidad fuera de la diana y toda la potencia de los anticuerpos presentes para activar las células vδ1 solo se produce en presencia de células tumorales.

Se cree que un mecanismo detrás de la capacidad de los linfocitos T γδ para detectar señales de estrés en las células tumorales se debe a los NCR (receptores de citotoxicidad naturales) que expresan. Los NCR son capaces de acoplar los ligandos de NCR en las células tumorales. Por lo tanto, se emplea un mecanismo de activación doble, en donde los linfocitos T γδ se activan a través de la estimulación de TCR y los NCR detectan las células tumorales para permitir una activación completa y la citotoxicidad.

Esto se diferencia de la estimulación de linfocitos T αß a través de CD3, en donde toda la estimulación es a través del TCR. Por lo tanto, tales células son casi indistintas entre células sanas o transformadas porque no tienen esta detección independiente de presentación de antígenos de las células tumorales a través de los NCR. Por lo tanto, si los anticuerpos contra CD3 tienen habilitación de Fc, atraerán otras células inmunitarias que pueden desencadenar una cascada de eventos impredecibles y deseables tales como tormentas de citocinas, agotamiento e incluso sobreactivación de células inmunitarias, lo que conduce, por ejemplo, a la inactivación de los linfocitos T por parte de las células NK, etc. En el presente enfoque, la estimulación de los linfocitos T γδ con los anticuerpos presentados en la presente no conduce a tales preocupaciones porque los linfocitos T γδ (y otras células inmunitarias tales como células NK) son capaces de distinguir entre células sanas y células tumorales, incluso a través de su mecanismo de detección de NCR y, por lo tanto, inactivan selectivamente las células estresadas tales como las células

cancerosas o las células infectadas viralmente por esta especificidad de células enfermas.

Por ejemplo, en estudios iniciales de *Macaca fascicularis* con el anticuerpo multiespecífico anti-vδ1 habilitados por Fc presentado en la presente, con especificidad tanto para antígeno vδ1 humano como de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 1 y SEQ D NO: 172), se descubrió que era seguro y bien tolerado, en estudios *in-vivo* de dosis crecientes, dosis repetidas por todos los parámetros medidos. No se observó ninguno de los efectos secundarios que se suelen asociar con la activación de linfocitos T, tales como liberación de citocinas o pérdida de peso.

Estos hallazgos también resaltan otra ventaja del enfoque descrito en la presente. Específicamente, y a diferencia de los TCE tipificados por acopladores de CD3 y similares, los biespecíficos de TCE de la invención se pueden diseñar opcionalmente como anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, que comprenden cadenas pesadas con un formato VH-CH1-CH2-CH3 con cadenas livianas cognadas con un formato VL-CL. A diferencia de los formatos biespecíficos más pequeños (por ejemplo, menores de 70 KDa), dicho formato biespecífico de longitud completa puede exhibir semividas *in vivo* más largas y, por lo tanto, puede requerir regímenes de dosificación menos frecuentes. Las semividas más largas que se observan por tales formatos son por una variedad de razones que incluyen mayor tamaño (>70 KDa) que significa que los riñones no filtran tales formatos (corte del tamaño de los poros del glomérulo 60-70 KDa). En una forma de realización, los anticuerpos multiespecíficos pueden ser mayores que alrededor de 70 KDa y pueden comprender secuencia de IGHC humana (por ejemplo, secuencia IGHA, IGHD, IGHD, IGHM, IGHG) según se enumera en IMGT. Tales formatos de IgG1 también pueden reciclarse por mecanismo de FcRn. La clara desventaja de dichos formatos de anticuerpo de longitud completa para biespecíficos de TCE en particular es que dicho formato exhibe perfiles de seguridad desfavorables debido a la tasa de depuración reducida, mayores exposiciones y más crónicas.

Por lo tanto, el enfoque presente permite la posibilidad de funcionalidad de Fc sin ninguna preocupación por los efectos secundarios, tales como las células NK que inactivan linfocitos T γδ o viceversa. Por lo tanto, el presente enfoque es superior a los enfoques dirigidos mediante CD3 que están atrasados por la necesidad de soluciones alternativas tales como reducir la afinidad de CD3, eliminar la función de Fc, etc. para limitar el daño colateral fuera del entorno tumoral. Los anticuerpos multiespecíficos, en particular los acopladores de linfocitos T, que se presentan aquí son capaces de fijarse a células vδ1 sin ningún daño potencial y solo se acopla la activación completa y mejora de la citotoxicidad cuando las células vδ1 están en contacto cercano con células tumorales.

Por lo tanto, en una forma de realización se proporciona un método para regular de manera descendente un TCR Vδ1 que contiene TRDV1 y el complejo de moléculas CD3 asociadas en la

superficie de una célula con un anticuerpo multiespecífico de TCE, y el uso de tales anticuerpos multiespecíficos para este propósito.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción proporcionada en la presente. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la descripción y los ejemplos específicos, si bien indican formas de realización preferidas de la invención, se proporcionan solo a modo ilustrativo, ya que diversos cambios y modificaciones se volverán evidentes para las personas del oficio de nivel medio. La invención se describirá ahora mediante los siguientes ejemplos no limitativos:

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Tablas

Se prepararon clones del anticuerpo parental de la manera establecida en los Ejemplos 1 a 19 en WO2021/032963.

Las secuencias de las CDR de los clones parentales se muestran a continuación en la Tabla 24.

Tabla 23. Aglutinantes de DV1 para la conversión de IgG

Clon ID	CDR1 pesada	SEQ ID NO.	CDR2 pesada	SEQ ID NO.	CDR3 pesada	SEQ ID NO.	CDR1 liviana	SEQ ID NO.	CDR2 liviana	SEQ	CDR3 liviana	SEQ ID NO.	100 nM de L1
1245_P02_G04	GDSVSSKSAA	51	TYYRSKWST	53	TWSGYVDV	54	QDINDW	79	DAS	80	QQSYSTPQVT	81	5896
1245_P01_E07	GFTFSDYY	130	ISSSGSTI	131	VDYADAFDI	132	QSIGTY	144	VAS	145	QQSYSTLLT	146	162591
1252_P01_C08	GFTVSSNY	317	IYSGGST	318	PIELGAFDI	319	NIGSQS	347	YDS	348	QVWDSSSDHVV	349	1977
1245_P01_B07	GFTFSDYY	320	ISSSGSTI	321	ENYLNAFDI	322	QSLSNY	350	AAS	351	QQSYSTPLT	352	64271
1251_P02_C05	GFTFSSYA	323	ISGGGGTT	324	DSGVAFDI	325	QNIRTW	353	DAS	354	QQFKRYPPT	355	65269
1139_P01_E04	GDSVSSNSAA	326	TYYRSKWYN	327	SWNDAFDI	328	QSISTW	356	DAS	357	QQSYSTPLT	358	23786
1245_P02_F07	GDSVSSNSAA	329	TYYRSKWYN	330	DYYYSMDV	331	QSISSW	359	DAS	360	QQSHSHPPT	361	10450
1245_P01_G06	GFTFSDYY	332	ISSSGSTI	333	HSWNDAFDV	334	QSISSY	362	AAS	363	QQSYSTPDT	364	22474
1245_P01_G09	GDSVSSNSAA	335	TYYGSKWYN	336	DYYYSMDV	337	QSISTW	365	DAS	366	QQSYSTPVT	367	18430
1138_P01_B09	GFTFSDYY	338	ISSSGSTI	339	HSWSDAFDI	340	QDISNY	368	DAS	369	QQSYSTPLT	370	29193

1251_P02_G10	GFTFSDYY	341	ISSSGSTIT	342	HSWNDAFDI	343	QSISSH	371	AAS	372	QQSYSTLLT	373	17053
1141_P01_E01	GYSFTSYW	344	IYPGDSDT	345	HQVDTRTADY	346	RSDVGGYNY	374	EVS	375	SSYTSTSTLV	376	136780

Los valores de K_D de los clones parentales, según se determinaron mediante análisis de SPR, fueron los siguientes:

Tabla 24. Resultados de captura de IgG

Analito	**Clon ID**	**K_D (nM)**	**K_D (M)**
L1 (DV1-GV4)	**1245_P01_E07**	12,4	1,24e-08
L1 (DV1-GV4)	**1252_P01_C08**	100	1,00e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P02_G04**	126	1,26e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P01_B07**	341	3,41e-07
L1 (DV1-GV4)	**1251_P02_C05**	1967*	1,97e-06
L1 (DV1-GV4)	**1139_P01_E04**	251	2,51e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P02_F07**	193	1,93e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P01_G06**	264	2,64e-07
L1 (DV1-GV4)	**1245_P01_G09**	208	2,08e-07
L1 (DV1-GV4)	**1138_P01_B09**	290	2,90e-07
L1 (DV1-GV4)	**1251_P02_G10**	829	8,29e-07
L1 (DV1-GV4)	**TS8.2** (anticuerpo anti-Vδ1 comercial)	44	4,40e-08

*La fijación de 1252_P02_C05 no alcanzó la saturación, por lo que se extrapolaron los datos

Se realizó un mapeo de epítopos para 5 de los clones parentales, mediante el uso de intercambio de hidrógeno-deuterio. En la **Tabla 25** se presenta un resumen de los resultados del mapeo de epítopos.

Tabla 25. Resultados del mapeo de epítopos para complejos de antígeno/anticuerpo

Clon ID	**Mapeo de epítopos, numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 272**
1245_P01_E07	5, 9, 16, 20, 62, 64, 72, 77
1252_P01_C08	50, 53, 59, 62, 64
1245_P02_G04	37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73, 77
1251_P02_C05	59, 60, 68, 72
1141_P01_E01	3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68, 69

EJEMPLO 2: Mejora conferida por anticuerpo multiespecífico de la citotoxicidad mediada por células efectoras Vδ1+; direccionamiento a un antígeno asociado con una enfermedad centrada en los tejidos.

Se realizaron estudios de ensayo de citotoxicidad/potencia para explorar el efecto de los anticuerpos multiespecíficos sobre los cocultivos de células efectoras Vδ1+ y células cancerosas A-431. Se sembraron células diana A-431 ($EGFR^{++}$; ATCC) en una placa para imágenes de 384 cavidades (Perkin Elmer) a 1.000 células/cavidad y se las incubó a 37 °C durante la noche en DMEM (10 % de FCS). Los anticuerpos y los anticuerpos multiespecíficos indicados se diluyeron hasta 10 µg/ml y se agregaron a la placa de ensayo (2 µg/ml de concentración final de ensayo). Se separaron linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel expandidos de matraces de cultivo de tejidos y se los diluyó en serie para obtener un rango de relaciones E:T (relación E:T máxima de 60:1) antes de agregarlos a la placa de ensayo. Las células A-431 se incubaron con linfocitos T γδ Vδ1 en presencia de anticuerpos o controles a 30 °C, 5 % de CO_2. Después de 24 horas de incubación, se agregó Hoechst 33342 (ThermoFisher) para teñir las células (2 µM finales). Para determinar la cantidad de células A-431 vivas, se adquirieron imágenes confocales con una plataforma de alto contenido Opera Phenix al capturar nueve campos de visión con un aumento de 10x. Los recuentos de células vivas se cuantificaron en función del tamaño, morfología, textura e intensidad de las tinciones de células vivas. Estudios de transcurso de tiempo de efector/diana (E:T) para determinar la relación ET en donde 50 % de las células diana se inactivan en sistemas modelo +/- los controles, comparadores, anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos indicados. Los resultados se presentan en la **Figura 31**.

En primer lugar, la **Figura 31 (A-D)** presenta resultados de cocultivo de ejemplo en donde se estudiaron cocultivos de Vδ1+/A-431 +/- anticuerpos multiespecíficos que comprendían porciones de fijación biespecífica anti-Vδ1 x anti-TAA (EGFR) en donde el dominio de fijación VL+VH anti-Vδ1 (a la primera diana) estaba combinado con el dominio CH1-CH2-CH3 de una porción de fijación anti-EGFR (a la segunda diana). Los controles y comparadores se emplearon de la manera indicada; de izquierda a derecha**:** Sin mAb = no se agregó anticuerpo; D1.3 = D1.3 control; D1.3 IgG LAGA = D1.3 + L235A,G237A; D1.3 FS1-67 = D1.3 dominio variable de EGFR con dominio constante de fijación a L235A, G237A; Cetuximab (generado internamente). Más específicamente, la **Figura 31 (A)** presenta los resultados de cocultivos de cinco horas con los controles y comparadores mencionados anteriormente y los siguientes artículos de prueba: C08-LAGA = 1252_P01_C08 con L235A,G237A; C08 FS1-67 =1252_P01_C08 combinado con dominio de fijación a EGFR que contiene L235A,G237A. La **Figura 31 (B)** presenta datos equivalentes de cocultivos de cinco horas con los controles y comparadores mencionados anteriormente y los siguientes artículos de prueba: G04-LAGA = 1245_P02_G04 con L235A,G237A; G04 FS1-67 =

1245_P02_G04 combinado con dominio de fijación a EGFR que contiene L235A,G237A. La **Figura 31 (C)** presenta datos equivalentes de cocultivos de cinco horas con controles, comparadores y los siguientes artículos de prueba: E07-LAGA = 1245_P01_E07 con L235A,G237A; E07 FS1-67 = 1245_P01_E07 combinado con dominio de fijación a EGFR que contiene L235A,G237A. La **Figura 31 (D)** presenta una tabla que resume el porcentaje de mejora de la citotoxicidad de los linfocitos T γδ Vδ1 en presencia de controles, comparadores y artículos de prueba a lo largo de 5, 12 y 24 horas. Se puede observar una mejora de más de 450 % cuando los anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos descritos en la presente se presentan en un formato multiespecífico.

En segundo lugar, la **Figura 31 (E-H)** presenta resultados de ejemplo en donde se estudiaron cocultivos de Vδ1+/A-431 +/- anticuerpos multiespecíficos que comprendían porciones de fijación biespecífica anti-Vδ1 x anti-TAA (EGFR) en donde el dominio de fijación anti-Vδ1 (a la primera diana) comprendía un anticuerpo de longitud completa (VH-CH1-CH2-CH3/VL-CL) luego combinado con una porción de fijación a scFv anti-EGFR (a la segunda diana). Los controles y comparadores se emplearon de la manera indicada; de izquierda a derecha**:** Sin mAb = no se agregó anticuerpo; D1.3 = control; D1.3 IgG LAGA = D1.3 + L235A,G237A; D1.3 LAGA cetuximab =D1.3 con L235A, G237A más un scFv derivado de cetuximab del terminal C; cetuximab (generado internamente). Más específicamente, la **Figura 31 (E)** presenta cocultivos de cinco horas con los controles y comparadores mencionados anteriormente y los siguientes artículos de prueba: C08-LAGA = 1252_P01_C08 con L235A,G237A; C08 LAGA cetuximab =1252_P01_C08 con L235A,G237A y con scFv derivado de cetuximab del terminal C. La **Figura 31 (F)** presenta un cultivo de cinco horas con los controles y comparadores mencionados anteriormente y los siguientes artículos de prueba: G04-LAGA = 1245_P02_G04 con L235A,G237A; G04 LAGA cetuximab = 1245_P02_G04 con L235A,G237A y con scFv derivado de cetuximab del terminal C. La **Figura 31 (G)** presenta un cultivo de cinco horas con controles, comparadores y los siguientes artículos de prueba: E07-LAGA = 1245_P01_E07 con L235A,G237A; E07 LAGA Cetuximab = 1245_P01_E07 con L235A,G237A y con scFv derivado de cetuximab del terminal C La **Figura 31 (H)** presenta una tabla que resume el porcentaje de mejora de la potencia de los linfocitos T γδ Vδ1 en presencia de controles, comparadores y artículos de prueba a lo largo de 5, 12 y 24 horas. Se puede observar una mejora de más de 300 % cuando los anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de estos descritos en la presente se presentan en un formato multiespecífico.

En tercer lugar, la **Figura 31 (I y J)** presentan un enfoque alternativo de ejemplo para representar los datos. Se muestra específicamente el porcentaje de mejora conferido por el anticuerpo multiespecífico E07 FS1-67 **(I)** o C08 FS1-67 **(J)** de la citotoxicidad de células efectoras Vδ1+ hacia células EGFR+ en el punto temporal de 24 horas en comparación con todas las partes

componentes, comparadores y moléculas de control, como se indica.

EJEMPLO 3: Expresión en mamíferos

Se seleccionaron dos clones para la maduración de afinidad. Los ejemplos anteriores describen la preparación y caracterización de clones con maduración de afinidad derivados del clon ADT1-4 (G04) y el clon ADT1-7 (E07).

Maduración de afinidad de anticuerpos monoclonales anti-Vd1 humanos

La expresión en fago empleada para generar anticuerpos parentales anti Vd1 monoclonales produjo anticuerpos con la afinidad que varía de 10 nM-1μM, como se describe anteriormente. El clon de anticuerpos parentales ADT1-4 (G04) y el clon ADT1-7 (E07) se maduraron por afinidad *in vitro* para lograr sorprendentemente 100 veces de afinidad mejorada para acoplamiento de la diana superior. La maduración de afinidad *in vitro* de anticuerpos parentales se logró a través de un proceso de dos etapas: diversificación de la secuencia de anticuerpos parentales mediante el uso de mutagénesis de CDR3 dirigida y luego enriquecimiento selectivo de los anticuerpos mejorados de afinidad con plataformas de expresión en fago y en mamíferos. Las colecciones de VH y VL CDR3 2-mer para los clones ADT1-4 y ADT1-7 se crearon mediante el uso de mutagénesis Kunkel (Kunkel *et al*., 1987; Sidhu y Weiss, 2004) y amplificación por RCA. Las combinaciones de todas las sustituciones de aminoácidos simples y dobles en las posiciones especificadas en las CDR3 VH y VL se incorporaron con la tecnología de síntesis de cebador Agilent. Se especificó la cantidad de aminoácidos diferentes a incorporar en una posición particular. Se omitieron la cisteína y metionina. Los cambios realizados en las CDR de los clones se resumen a continuación en la Tabla 26.

Tabla 26. Posiciones de CDR3 y cambios de residuos especificados

	POS	AMINOÁCIDOS	POS	AMINOÁCIDOS
E07 (V3-11/Vκ1-39)	V	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,W,Y	Q	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W,Y
	D	A,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	Y	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W	Y	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W
	A	D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	D	A,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	T	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y
	A	D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	L	A,D,E,F,G,H,I,K,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	F	A,G,H,I,L,N,P,S,T,V,Y	L	A,D,E,F,G,H,I,K,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	D	A,G,N,S,T	R'	A,G,Q,S,T,V
	I	G,S,V,Y		
G04 (VH6-1/Vκ1-5)	POS	AMINOÁCIDOS	POS	AMINOÁCIDOS
	T	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	W	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,Y	Y	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W
	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y	S	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	G	A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	T	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y
	Y	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W	P	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,Q,R,S,T,V,W,Y
	V	A,F,G,H,I,L,N,P,S,T,Y	Q	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W,Y
	D	A,G,N,S,T	V	A,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,W,Y
	V	G,I,S,Y	Q'	A,G,R,S,T,V

El tamaño de cada colección se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Tamaño de colección

ADT1-7	5,4

304

	x10^9
ADT1-4	5,5 x10^9

Generación de colecciones de CDR3 VH y VL mutagenizadas

Las colecciones mutagenizadas se prepararon a partir de volúmenes de cultivos adecuados que cubren un exceso adecuado miembros de colecciones. La maduración de afinidad se realizó con la tecnología de expresión en fago como se describe en Schofield *et al*. (2007) con la selección de expresión en solución. Las selecciones se realizaron en las soluciones con el antígeno humano y de *Macaca fascicularis*. Para aislar los aglutinantes de una colección mutante con afinidades más altas, se controló la concentración de antígenos para obtener una serie de selecciones cada vez más estrictos. Se realizaron diversas rondas de selecciones de expresiones en fago con antígeno humano y de *Macaca fascicularis* para cada clon como se presenta en la Figura 1. Para el linaje ADT1-4, la concentración de antígeno utilizada en la selección varió de 100 nm-10 pM para el antígeno humano y 100 nM y 10 nM para el antígeno de *Macaca fascicularis*. Para el linaje ADT1-7, el antígeno humano se usó a concentración de 10 nM a 1 pM y para *Macaca fascicularis* de 100 nM a 100 pM. La Figura 1 muestra las rondas de selección de fagos para la colección ADT1-7 (iA), la colección ADT1-4 (iB) y la colección ADT1-7 con una estrategia de selección para aislar aglutinantes de reactividad cruzada de *Macaca fascicularis* (iC).

Se usó ELISA de fago policlonal para evaluar el progreso de las selecciones. DV1/GV4 humano y DV1/GV76 de *Macaca fascicularis* se revistieron durante la noche a 150 ng/cavidad, 50 µl/cavidad. Se usaron DV2/GV76 de *Macaca fascicularis* y HSA como controles. Solo los resultados de la colección ADT4-1 reactivaron de forma cruzada al antígeno DV1 humano y de *Macaca fascicularis.* El resultado de ADT1-7 solo fue reactivo al antígeno humano. Los resultados seleccionados se caracterizaron adicionalmente mediante ELISA de fago monoclonal y el resumen se presenta en la Tabla 28. Los recuadros gris claro y oscuro indican que la selección se llevó a cabo con antígeno humano y de *Macaca fascicularis*, respectivamente. Las flechas proporcionan una indicación respecto al porcentaje de clones que se clasifican como aglutinantes para VD1 humano o de *Macaca fascicularis* (si apunta hacia arriba es alto y si apunta hacia abajo es bajo).

Tabla 28. Resumen de ELISA de fago monoclonal

G04	rondas de fago			Fijación	
selección	#1	#2	#3	huDV1	cyDV1
2378	10nM	1nM		↑ 79%	↘ 25%
2409			100pM	↑ 75%	↑ 100%
2412			10nM	↗ 72%	↑ 100%
2413		10nM	1nM	↑ 84%	↑ 100%
2385	100nM	10nM		↗ 71%	↑ 75%
2418			1nM	↑ 100%	↑ 94%
2420			1nM	↑ 94%	↑ 94%
2415		10nM	10nM	↑ 100%	↑ 94%

E07	rondas de fago				
selección	#1	#2	#3	huDV1	cyDV1
2370	1nM	100pM		↑ 96%	↓ 0%
2404			10pM	↑ 83%	↓ 0%

La diversidad de secuencia se resume en la Tabla 29. Los recuadros gris claro y oscuro indican que la selección se llevó a cabo con antígeno humano y de *Macaca fascicularis*, respectivamente. Las flechas proporcionan una indicación respecto al nivel de diversidad (si apunta hacia arriba es alto y si apunta hacia abajo es bajo).

Tabla 29. Resumen de secuencia monoclonal en fago

G04	rondas de fago			diversidad		
selección	#1	#2	#3	CDR3 pesada	CDR3 liviana	CDR3 pesada-liviana
2378	10nM	1nM		↑ 83%	↑ 96%	↑ 100%
2409			100pM	↘ 50%	↘ 53%	↗ 72%
2412			10nM	↘ 63%	↑ 97%	↑ 97%
2413		10nM	1nM	↗ 71%	↑ 97%	↑ 100%
2385	100nM	10nM		↑ 83%	↑ 88%	↑ 100%
2418			1nM	↗ 66%	↗ 81%	↑ 88%
2420			1nM	↘ 63%	↗ 73%	↗ 80%
2415		10nM	10nM	↘ 63%	↗ 78%	↑ 88%

E07	rondas de fago			CDR3 pesada	CDR3 liviana	CDR3 pesada-liviana
selección	#1	#2	#3			
2370	1nM	100pM		↑ 88%	↑ 96%	↑ 100%
2404			10pM	↗ 75%	↗ 67%	↑ 96%

Generación de colecciones de expresión en mamíferos de IgG

Para formar colecciones finales para expresión en mamíferos se recolectaron las siguientes selecciones de ADT1-4:

– SEL2409, 2412 y 2413 para crear la colección 1 de ADT1-4 (humana)

– SEL 2418, 2420 y 2415 para crear la colección 2 de ADT1-4 (de *Macaca fascicularis*)

– SEL2370 y 2404 para crear la colección ADT1-7.

Los recuentos luego se avanzaron a la expresión en mamíferos. Las poblaciones de anticuerpos de fragmento variable monocatenario (scFvs) se convirtieron *en masse* en el formato IgG, lo que mantuvo el emparejamiento original de cadena variable pesada (VH) y cadena variable liviana (VL). Luego, los anticuerpos con formato IgG se clonaron en un vector donante de expresión en mamíferos que se cotransfectó con plásmidos que codifican un par de nucleasa TALE para permitir la integración génica de anticuerpos dirigidos a nucleasa en un único locus cromosómico. Se creó una colección de anticuerpos de expresión en mamíferos que cubre la diversidad de resultado de expresión (clones $>10^6$) en células HEK293. Las poblaciones estables de células que expresan anticuerpos en la superficie celular se seleccionaron mediante adición de blasticidina 2 días después de la transfección (dpt). Las células que expresan anticuerpos en la superficie celular se enriquecieron mediante clasificación magnética activada de células (MACS) (7 dpt); las células se etiquetaron con anti-Fc-PE seguido de microesferas anti-PE y clasificadas con imán Midi MACS (Miltenyi Biotec) y columnas de LS. Estas poblaciones de células se avanzaron a selecciones.

Selección de anticuerpos maduros mediante expresión en mamíferos

Luego de MACS para enriquecer las células que expresan anticuerpos, se adoptaron dos estrategias para identificar aglutinantes TRDV1. La estrategia principal implicó la clasificación de fluorescencia de color dual en función de la expresión de Fc y la fijación al antígeno. La otra clasificación de fluorescencia de color dual en función de la fijación de los antígenos de *Macaca fascicularis* y humanos para maximizar las posibilidades de aislar los aglutinantes de reactividad cruzada de alta afinidad. Un resumen esquemático del proceso se presenta en la Figura 2.

Secuencia, especificidad, clasificación de afinidad y caracterización

El ADN genómico se extrajo de ocho poblaciones diferentes separadas. El ADN que codifica las IgG se amplificó y se clonó en un vector de expresión de IgG1 soluble. Se eligió un total de 1472 clones a partir de las 8 selecciones diferentes. El pADN se transfectó en células Expi293. Los sobrenadantes se recolectaron 5 días después de la transfección y la afinidad de anticuerpos expresada se clasificó para la fijación de TRDV1 humana y de *Macaca fascicularis* en un ELISA de captura. Un total de 93 anticuerpos anti-DV1 de cada cadena de selección se

eligieron para análisis de secuencia y de constante SPR. Además, estos clones se controlaron mediante ELISA directo para detectar la fijación a: TRDV1 humana, TRDV1 humana (A ->V), TRDV2 humana, TRDV1 de *Macaca fascicularis* y BSA.

EJEMPLO 4: AFINIDAD DE FIJACIÓN A ANTÍGENOS HUMANOS Y DE *MACACA FASCICULARIS*

Fijación a antígeno recombinante y TCR vδ1 expresado en células: Linaje ADT1-4

Los estudios se realizaron para explorar la fijación de anticuerpos antivδ1 a sus antígenos diana. La fijación de mAb vd1 al antígeno de TCR vd1 se evaluó mediante ELISA. 1 ug de antígeno humano o 1 ug de antígeno de *Macaca fascicularis* se inmovilizó por cavidad sobre placas de inmunoensayo de 96 cavidades (SLS N.° 475904) y luego se bloqueó con BSA para evitar la fijación no específica. Se agregaron 1,3 pmol (20 ng) de cada mAb y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La fijación de mAb al antígeno se detectó con ProteinA-HRP (Abcam N.° Ab7456) junto con el sustrato TMB (Fisher N.° 12750000) y la solución de detención (Biolegend N.° 423001) al medir la absorbancia a 450 nM. Los controles parentales se incluyeron como controles positivos tanto para la variabilidad de ensayo como para la variabilidad interplaca. Los resultados positivos se identificaron como aquellos mAb que dan lectura de absorbancia por encima de aquellos de los mAb parentales. La **Figura 5A** muestra el aumento en veces de la absorbancia para los clones de ADT1-4 maduros en comparación con la absorbancia de fijación a ADT1-4 parental cuando se fijaron 1,3 pmol de anticuerpo al antígeno vδ1 humano. La **Figura 5B** muestra el aumento en veces de la absorbancia para los clones de ADT1-4 maduros en comparación con la absorbancia de fijación a ADT1-4 parental cuando se fijaron 1,3 pmol de anticuerpo al antígeno vδ1 de *Macaca fascicularis*.

Se evaluó la fijación de mAb a TCR vd1 endógeno mediante citometría de flujo. Las células vd1 de piel (donante ATS006; ADT expandido E0000113) o la línea celular vδ1 PEER se sembraron a 3x10^5células/cavidad en placas de fondo redondo de 96 cavidades y se volvió a suspender en 50 ul de amortiguador FACS (v/v: 2 % de FCS, 0,1 % de NaAzide y 1 mM de EDTA en PBS) que contiene 3 ug/ml de mAb de prueba durante 15 min a 4 °C. Las células se convirtieron en pélets y el anticuerpo secundario anti-hmIgG-APC (Miltenyi N.° 130-119-772) se agregó a 1/100 en amortiguador FACS y se incubó durante 20 min más a 4 °C. Las células se lavaron y fijaron en CellFix (BD N.° 340181) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se calculó el % de fenotipo vd1 e intensidad de fluorescencia media (Inivai Technologies, Flowlogicv7.2). Como un control positivo se incluyó el anticuerpo parental. La **Figura 5C** muestra el aumento en veces de la media de intensidad de fluorescencia para los clones de ADT1-4 maduros en comparación con ADT1-4 parental fijado a células vδ1 humanas derivadas de la piel primarias. La **Figura 5D** muestra el aumento en veces de la media de intensidad de fluorescencia

para los clones de ADT1-4 maduros en comparación con ADT1-4 parental fijado a la línea celular vδ1 PEER transformada.

Fijación a antígeno recombinante y TCR vδ1 expresado en células: Linaje ADT1-7:

Los estudios se realizaron para explorar la fijación de anticuerpos anti-vδ1 ADT1-7 maduro a sus antígenos diana. La fijación de mAb vd1 al antígeno de TCR vd1 se evaluó mediante ELISA. 1 ug de antígeno humano se inmovilizó por cavidad sobre placas de inmunoensayo de 96 cavidades (SLS N.° 475904) y luego se bloqueó con BSA para evitar la fijación no específica. Se agregó una titulación de 6,7 pmol (100 ng), 1,3 pmol (20 ng) y 0,27 pmol (4 ng) de mAb y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La fijación de mAb al antígeno se detectó con ProteinA-HRP (Abcam N.° Ab7456) junto con el sustrato TMB (Fisher N.° 12750000) y la solución de detención (Biologend N.° 423001) al medir la absorbancia a 450 nM. Los controles parentales se incluyeron como controles positivos tanto para la variabilidad de ensayo como para la variabilidad interplaca. Los resultados positivos se identificaron como aquellos mAb que dan lectura de absorbancia por encima de aquellos de los mAb parentales. La **Figura 6A** muestra el aumento en veces de la absorbancia para los clones de ADT1-4 maduros en comparación con la absorbancia de fijación a ADT1-4 parental cuando se fijaron 1,3 pmol de anticuerpo al antígeno vδ1 humano.

Se evaluó la fijación de mAb a TCR vd1 endógeno mediante citometría de flujo. Las células vδ1 de piel (donante ATS006; ADT expandido E0000113) o la línea celular vδ1 PEER se sembraron a 3x10^5células/cavidad en placas de fondo redondo de 96 cavidades y se volvió a suspender en 50 ul de amortiguador FACS (v/v: 2 % de FCS, 0,1 % de NaAzide y 1 mM de EDTA en PBS) que contiene 3 ug/ml de mAb de prueba durante 15 min a 4 °C. Las células se convirtieron en pélets y el anticuerpo secundario anti-hmIgG-APC (Miltenyi N.° 130-119-772) se agregó a 1/100 en amortiguador FACS y se incubó durante 20 min más a 4 °C. Las células se lavaron y fijaron en CellFix (BD N.° 340181) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se calculó el % de fenotipo vd1 e intensidad de fluorescencia media (Inivai Technologies, Flowlogicv7.2). Como un control positivo se incluyó el anticuerpo parental. La **Figura 6B** muestra el aumento en veces de la media de intensidad de fluorescencia para los clones de ADT1-4 maduros en comparación con ADT1-4 parental fijado a células vδ1 humanas derivadas de la piel primarias. La **Figura 6C** muestra el aumento en veces de la media de intensidad de fluorescencia para los clones de ADT1-7 maduros en comparación con ADT1-7 parental fijado a la línea celular vδ1 PEER transformada.

Mejoras en veces en comparación con los clones parentales

Inmunoensayo de fluorescencia por lantánidos con disociación mejorada (DELFIA)

Para confirmar la mejora en la fijación de mAb maduro de afinidad a los antígenos humanos y de *Macaca fascicularis*, se realizó un inmunoensayo DELFIA, en donde el antígeno se colocó

directamente sobre la placa a modo de recubrimiento (3 µg/ml de antígeno en 50 µl de PBS) a 4 °C durante la noche (Nunc N.° 437111). Para la detección se usó Anti-IgG humana DELFIA Eu-N1 (Perkin Elmer N.° 1244-330) como anticuerpo secundario a una dilución de 1/500 en 50 µl de 3 % de MPBS (PBS + 3 % (p/V) de leche descremada en polvo). El desarrollo fue con 50 µl de solución mejoradora de DELFIA (Perkin Elmer N.° 4001-0010).

Se realizó una clasificación por afinidad del anticuerpo de interés con el inmunoensayo DELFIA, en el que los anticuerpos se capturaron mediante proteína G colocada como recubrimiento sobre la placa y se agregó antígeno L1 biotinilado soluble (DV1-GV4) a 0,4 nM y antígeno de *Macaca fascicularis* **DV1/GV77** a 10 nM (3MPBS). Para la detección se usaron 50 µl de estreptavidina-Eu (1:500 en amortiguador de ensayo, Perkin Elmer) y la señal se desarrolló con solución mejoradora de DELFIA. Se usó D1.3 hIgG1 (descrito en England *et al*. (1999) *J. Immunol.* 162: 2129-2136) como un control negativo. Los resultados se muestran en las Figuras 7A a C.

Análisis de SPR - captura de IgG

El análisis de SPR se utilizó para comparar los valores de KD para los clones con maduración de afinidad en comparación con los clones parentales. Instrumento usado: MASS-2 (Sierra Sensors); Chip: de alta capacidad de amina (Sierra Sensors); amortiguador de corrida PBS + 0,02 % de Tween 20. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente o 37 °C, la proteína G se acopló al chip. Se pasó el antígeno por encima de la célula en una serie de dilución de 50 nM a 0,2 nM para DV1-GV4 humano y de 100 nM a 1 nM para DV1-77 de *Macaca fascicularis*. Asociación de 120 segundos, asociación de 600 segundos, velocidad de flujo de 50 µl/min, regeneración con 10 mM de glicina pH 1,5 de ajuste cinético de acuerdo con fijación de Langmuir 1:1 con el *software* Sierra Analyzer. Los resultados se muestran en las Figuras 8A a C.

Análisis de afinidad de fijación (KD mediante SPR)

Afinidad de fijación de anticuerpo contra Vδ1 monoclonal al antígeno Vδ1

La afinidad de fijación de los anticuerpos a la diana (es decir, la cadena Vδ1 de un TCR γδ) se establece mediante análisis SPR con un instrumento Reichert 4SPR (Reichert Technologies). El anticuerpo (1,5 ug/ml) se recubre sobre un chip sensor de proteína A plana (Reichert Technologies) para obtener un aumento al inicio de aproximadamente 500 uRIU. Se pasó antígeno (por ejemplo, L1 (DV1-GV4) por encima de la célula en una serie de dilución de 1:3 desde 300 nM hasta 3,7 nM con los siguientes parámetros: 180 s de asociación, 600 s de disociación, velocidad de flujo 25 µl/min, amortiguador de corrida PBS + 0,05 % de Tween 20. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. El ajuste de estado estacionario se determinó de acuerdo con una fijación de Langmuir 1:1 mediante el uso del *software* TraceDrawer (Reichert Technologies).

Antígeno humano

Los mAb Vδ1 con maduración de afinidad exhiben afinidad mejorada en gran medida para el antígeno Vδ1 humano que es parental como lo determina el análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (Figura 9). **(A, B)** El análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) se realizó con los mAb parentales ADT1-4 **(A)** o ADT1-7 **(B)** y sus derivados con maduración de afinidad para determinar la afinidad de fijación al antígeno Vδ1 humano. La interacción de fijación de Vδ1 y los mAb con maduración de afinidad se modelaron de acuerdo con la fijación Langmuir 1:1. **(C, D)** Tablas que resumen la constante de disociación de equilibrio (KD) de los anticuerpos dirigidos a Vδ1, como se deriva de los sensogramas ilustrados en **(A)** y **(B).** Los datos se representan como la media de dos réplicas realizadas en dos instrumentos de SPR diferentes. **(E, F)** Gráficos de barras que representan el aumento en veces en la constante de disociación de equilibrio (KD) del derivado con maduración de afinidad al antígeno Vδ1, en comparación con su progenitor, ADT1-4 o ADT1-7.

Conclusiones: Estos datos demuestran que los derivados con maduración de afinidad de ADT1-4 y ADT1-7 demuestran una afinidad significativamente mayor de antígeno Vδ1 humano que los anticuerpos parentales.

Antígeno de Macaca fascicularis

El análisis de resonancia de plasmones superficiales demuestra que los mAb Vδ1 con maduración de afinidad del linaje ADT1-4 muestran una afinidad significativamente mayor al antígeno Vδ1 de *Macaca fascicularis* que el anticuerpo parental (Figura 10). **(A)** El análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) se realizó con anticuerpo parental ADT1-4 y los derivados con maduración de afinidad para determinar la afinidad de fijación para el antígeno Vδ1. La interacción de fijación de Vδ1 y los mAb con maduración de afinidad se modelaron de acuerdo con la fijación Langmuir 1:1. **(C, D)** Tabla que resume la constante de disociación de equilibrio (KD) de los anticuerpos dirigidos a Vδ1, como se deriva de los sensogramas ilustrados en **(A).** Los datos se representan como la media de dos réplicas realizadas en dos instrumentos de SPR diferentes. Los resultados se muestran en la Figura 10A y 10B.

Conclusiones: Estos datos demuestran que los derivados con maduración de afinidad de ADT1-4 demuestran una afinidad significativamente mayor al antígeno Vδ1 de *Macaca fascicularis* que el anticuerpo parental.

Afinidad de fijación a TCR Vδ1 de superficie celular (EC50 para fijación a Vδ1 de superficie celular).

Los mAb Vδ1 con maduración de afinidad exhiben una afinidad significativamente mayor con los linfocitos T γδ Vδ1 positivos, sin fijación demostrable a las células que carecen de Vδ1, como se muestra en las Figuras 11A a D. **(A, B)** El nivel de fijación de los mAb Vδ1 para dos donantes de linfocitos T γδ, ATS006 (A) y TS164 (B). Los linfocitos T γδ se tiñeron con

concentraciones variables de mAb Vδ1, seguido de anticuerpo de detección de anti-IgG humana fluorescente (xxx). Todas las etapas de incubación se llevaron a cabo a 4 °C y la fijación de mAb se determinó mediante el uso de citometría de flujo para medir el nivel de mediana de fluorescencia. Las curvas de dosis-respuesta de cuatro parámetros logarítmicos se ajustaron mediante el uso de GraphPad Prism 9. **(C)** Gráfico de barras que representa el promedio de IC50 de la fijación de los clones ADT1-4 y ADT1-7 a linfocitos T γδ Vδ1 positivos, representado como la media de dos donantes. **(D)** Tabla que resume los EC50 graficados en (**A**) y (**B**), y tipos de células Vδ1 negativas que incluyen células HEK293A, Raji y diversos subconjuntos de leucocitos con células mononucleares de sangre primarias. Para linfocitos T γδ Vδ1 positivos, los datos se representan como la media de dos donantes.

Conclusiones: Estos datos demuestran que los derivados con maduración de afinidad de ADT1-4 y ADT1-7 demuestran una afinidad significativamente mayor a linfocitos T γδ antígeno Vδ1 positivos que sus mAb parentales, mientras que no muestran fijación a células Vδ1 negativas HEK293T, Raji o CD8, CD4, NK, CD19 o células monocíticas dentro de las PBMC.

Fijación a célula diana de los anticuerpos Vδ1 monoclonales

Una gama de células diana se sometió a ensayo para determinar la especificidad y afinidad de la fijación de mAb Vδ1. Esto incluye los linfocitos T γδ Vδ1 derivados de piel expandidos, las células HEK293T, las células Raji y múltiples subconjuntos de leucocitos dentro de las células mononucleares de sangre humana primaria. Las células adherentes o semiadherentes (linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel, HEK293T) se separaron del matraz de cultivo de tejidos y se volvieron a suspender en PBS. De manera similar, los tipos de células no adherentes (Raji, PBMC), se recolectaron y se volvieron a suspender en PBS. Las células se sembraron a una densidad final de 100.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades de fondo en forma de v. Las células se sometieron a centrifugación y los pélets celulares se volvieron a suspender en reactivo de bloqueo de FcR de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C antes de un lavado adicional. mAb Vδ1, control de IgG anti-RSV y OKT3 anti-CD3 se diluyeron hasta 500 nM en PBS y se diluyeron en serie 1:5 en PBS hasta 6,4 pM, y se agregaron a las células, seguido de una incubación de 20 minutos a 4 °C. Para determinar la cantidad de mAb que se fija a la superficie celular, las células se tiñeron con un anticuerpo secundario anti-IgG humana murino, conjugado con APC (código de producto, dilución: 1:100). Para los linfocitos T γδ Vδ1, HEK293T y Raji, las células también se tiñeron solamente con un tinte de viabilidad. Para PBMC, también se incluyeron los anticuerpos conjugados contra CD4, CD8, CD56, CD11b y CD19 (todos a 1:100), lo que permitió la discriminación de subconjuntos αβ, células NK, linfocitos B y células monocíticas. Tras 20 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavaron dos veces y la fluorescencia se midió con el MACSQuant. Las IC50 se muestran en la Figura 11D.

Resumen de valores de KD para linaje ADT1-4 (humano y de *Macaca fascicularis*)

La tabla a continuación proporciona los valores de KD para los 24 clones en el linaje ADT1-4 y el clon parental ADT1-4 (G04) (para su fijación a TRDV1 humano y TRDV1 de *Macaca fascicularis*):

	HUMANO	**HUMANO**	***Macaca fascicularis***	***Macaca fascicularis***
Clon ID	**K_D [M]**	**K_D (nM)**	**K_D [M]**	**K_D (nM)**
ADT1-4	1,26E-07	126 nM	N/A	N/A
ADT1-4-19	1,63E-10	0,163 nM	3,40E-09	3,40 nM
ADT1-4-21	4,41E-10	0,441 nM	6,79E-09	6,79 nM
ADT1-4-31	5,22E-10	0,522 nM	9,43E-09	9,43 nM
ADT1-4-53	6,08E-10	0,608 nM	5,34E-09	5,34 nM
ADT1-4-2	1,95E-10	0,195 nM	3,08E-09	3,08 nM
ADT1-4-8	5,41E-10	0,541 nM	1,51E-08	15,1 nM
ADT1-4-82	2,49E-10	0,249 nM	1,67E-08	16,7 nM
ADT1-4-83	2,41E-10	0,241 nM	1,58E-08	15,8 nM
ADT1-4-84	2,27E-10	0,227 nM	1,16E-08	11,6 nM
ADT1-4-86	9,39E-10	0,939 nM	9,49E-09	9,49 nM
ADT1-4-95	6,42E-10	0,642 nM	1,50E-08	15,0 nM
ADT1-4-105	3,81E-10	0,381 nM	1,01E-08	10,1 nM
ADT1-4-107	1,77E-10	0,177 nM	1,05E-08	10,5 nM
ADT1-4-110	3,33E-10	0,333 nM	1,19E-08	11,9 nM
ADT1-4-112	7,84E-10	0,784 nM	1,11E-08	11,1 nM
ADT1-4-117	2,45E-10	0,245 nM	1,01E-08	10,1 nM
ADT1-4-139	4,99E-10	0,499 nM	2,69E-08	26,9 nM
ADT1-4-4	5,19E-10	0,519 nM	1,62E-08	16,2 nM
ADT1-4-143	4,63E-10	0,463 nM	9,39E-09	9,39 nM
ADT1-4-173	9,07E-10	0,907 nM	2,40E-08	24,0 nM
ADT1-4-3	9,35E-10	0,935 nM	2,85E-08	28,5 nM
ADT1-4-1	8,00E-11	0,08 nM	4,1E-10	0,41 nM
ADT1-4-6	1,06E-9	1,06 nM	1,01E-9	1,01 nM
ADT1-4-138	4,38E-8	43,8 nM	3,47E-8	34,7 nM

Resumen de valores de KD para linaje ADT1-7 (solo humano)

La tabla a continuación proporciona los valores de KD para los 11 clones en el linaje ADT1-7 y el clon parental ADT1-7 (E07) (para su fijación solo a TRDV1 humano):

Clon ID	K_D [M]	K_D (nM)
ADT1-7	1,24e-08	12,4 nM
ADT1-7-10	1,30E-09	1,30 nM
ADT1-7-15	1,42E-09	1,42 nM
ADT1-7-17	1,26E-09	1,26 nM
ADT1-7-18	1,61E-09	1,61 nM
ADT1-7-19	1,19E-09	1,19 nM
ADT1-7-20	1,17E-09	1,17 nM
ADT1-7-22	1,18E-09	1,18 nM
ADT1-7-23	1,29E-09	1,29 nM
ADT1-7-42	1,51E-09	1,51 nM
ADT1-7-3	8,31E-10	0,831 nM
ADT1-7-61	5,57E-10	0,557 nM

Resumen de datos farmacológicos para los miembros preferidos del linaje ADT1-4

	HUMANO	**HUMANO**	***Macaca fascicularis***	***Macaca fascicularis***	**IC50 TCR DR (no THP-1)**	**IC90 TCR DR (no THP-1)**	**Inactivación de IC50**	**Inactivación de IC90**
Clon ID	**K_D [M]**	**K_D (nM)**	**K_D [M]**	**K_D (nM)**				
ADT1-4	1,26E-07	126 nM	N/A	N/A	N/A	N/A	2,603E-08 (26,03 nM)	7,048E-08
ADT1-4-19	1,63E-10	0,163 nM	3,40E-09	3,40 nM	3,67E-10 (0,367 nM)	1,583E-9 (1,583 nM)	1,12E-09 (1,12 nM)	8,38E-09 (8,38 nM)
ADT1-4-21	4,41E-10	0,441 nM	6,79E-09	6,79 nM	2,66E-10 (0,266 nM)	8,92E-10 (0,892 nM)	9,4E-10 (0,94 mM)	5,88E-09 (5,88 nM)
ADT1-4-31	5,22E-10	0,522 nM	9,43E-09	9,43 nM	2,45E-10 (0,245 nM)	1,091E-9 (1,091 nM)	1,63E-09 (1,63 nM)	1,658E-08 (16,58 nM)
ADT1-4-53	6,08E-10	0,608 nM	5,34E-09	5,34 nM	2,54E-10 (0,254 nM)	6,98E-10 (0,698 nM)	1,05E-09 (1,05 nM)	4,23E-09 (4,23 nM)

ADT1-4-2	1,95E-10	0,195 nM	3,08E-09	3,08 nM	3,1E-10 (0,31 nM)	8,34E-10 (0,834 nM)	8,7E-10 (0,87 nM)	3,12E-09 (3,12 nM)
ADT1-4-86	9,39E-10	0,939 nM	9,49E-09	9,49 nM	3,07E-10 (0,307 nM)	1,001E-9 (1,001 nM)	1,05E-09 (1,05 nM)	4,3E-09 (4,3 nM)
ADT1-4-112	7,84E-10	0,784 nM	1,11E-08	11,1 nM	2,95E-10 (0,295 nM)	1,093E-9 (1,093 nM)	9E-10 (0,9 nM)	3,8E-09 (3,8 nM)
ADT1-4-143	4,63E-10	0,463 nM	9,39E-09	9,39 nM	3,13E-10 (0,313 nM)	8,53E-10 (0,853 nM)	1,78E-09 (1,78 nM)	1,42E-08 (14,2 nM)
ADT1-4-1	8,00E-11	0,08	4,1E-10	0,41	3,604E-10 (0,3604 nM)	6,702E-10 (0,6702 nM)	1,4E-10 (0,14 nM)	2,8E-10 (0,28 nM)
ADT1-4-6	1,06E-9	1,06	1,01E-9	1,01	4,796E-10 (0,4796 nM)	1,911E-9 (1,911 nM)	1,4E-10 (0,14 nM)	2E-10 (0,2 nM)
ADT1-4-138	4,38E-8	43,8	3,47E-8	34,7	8,384E-9 (8,384 nM)	3,83E-8 (38,3 nM)	3,8E-10 (0,38 nM)	6,44E-09 (6,44 nM)

Resumen de datos farmacológicos para los miembros preferidos del linaje ADT1-7

Clon ID	**K_D [M]**	**K_D (nM)**	**IC50 TCR DR (no THP-1)**	**IC90 TCR DR (no THP-1)**	**Inactivación de IC50**	**Inactivación de IC90**
ADT1-7	1,24e-08	12,4 nM	-	-	5,53E-09 (5,53 nM)	7,48E-08 (74,8 nM)
ADT1-7-20	1,17E-09	1,17 nM	1,64E-10 (0,164 nM)	1,036E-9 (1,036 nM)	2,80E-10 (0,28 nM)	2,47E-09 (2,47 nM)
ADT1-7-3	8,31E-10	0,831 nM	1,61E-10 (0,161 nM)	7,90E-10 (0,79 nM)	1,60E-10 (0,16 nM)	1,06E-09 (1,06 nM)
ADT1-7-61	5,57E-10	0,557 nM	6,264E-9 (6,264 nM)	1,704E-6* (1704,445 nM)	4,20E-10 (0,42 nM)	1,66E-08 (16,6 nM)

*Artefacto de datos debido a que no se alcanza 100 % de inhibición para este clon

EJEMPLO 5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

Anticuerpos monoclonales Vδ1 en regulación descendente de TCR

La capacidad de mAb ADT para acoplarse con receptores de linfocitos T γδ y, como resultado, regularlos de forma descendente se evalúa al medir la expresión de TCR. Los linfocitos T γδ de la piel (del donante ATS006 y TS164) se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 cavidades a 3x10^5 células/ml en un medio γδ con aumento de la concentración de los mAb de prueba (rango de 0,00067 a 67 nM) o la concentración más alta (67 nM) del control de isotipo correspondiente (hIgG1, RSV), diluido en PBS. Las células se incubaron durante 2 horas en una cámara de CO2 humidificada a 37 °C. Las células se lavaron y se tiñeron para detectar células

muertas (Thermo Fisher N.° 15580607) y sus TCR VD1 (Miltenyi N.° 130-117-697) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador de FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences N.° 340181) antes de incubar durante la noche a 4 °C en la oscuridad. El nivel de expresión de TCR VD1, determinado mediante mediana de intensidad de fluorescencia (MFI), se midió mediante citometría de flujo al día siguiente con el MACS Quant Analyzer 16.

Los resultados se muestran en la Figura 12, que muestra los mAb Vδ1 con maduración de afinidad y regula de forma descendente TCR Vδ1 de manera más eficaz que su clon parental y OKT3. (A y B). Cuantificación de la expresión de TCR γδ después de 2 horas de incubación de células γδ con mAb Vδ1 y OKT3 antes de la tinción de TCR Vδ1 con un TCR Vδ1 PE-Vio770. Se adquirió MFI de una tinción Vδ1 mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región TCR positiva antes de calcular % de MFI del MFI de células γδ sin tratar, TCR positivas. El gráfico superior representa los datos del linaje ADT1-4 y el gráfico inferior representa los datos del linaje ADT1-7. (C) Gráfico de barras que representa los valores de IC50 calculados de (A). (D y E). Gráfico de barras que representa los valores de IC50 en (B) presentados como mejora en veces a partir del ADT1-4 (izquierda) y ADT1-7 (derecha) parental. (F) Tabla que representa los valores de IC50 de (B) con la mejora de porcentaje calculada a partir de los de ADT1-4 (superior) y ADT1-7 (inferior) parentales respectivos. (G) Tabla que representa los valores de IC50 de (B) con la mejora en veces calculada a partir de los de ADT1-4 (superior) y ADT1-7 (inferior) parentales respectivos.

Anticuerpos monoclonales Vδ1 en activación de γδ medida mediante expresión de CD107a

La capacidad de mAb ADT para acoplarse con células VD1 γδ y activarlas se evalúa al medir la expresión de CD107a. Los linfocitos T γδ de la piel (del donante ATS006) se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 cavidades a 6x10^5 células/ml en un medio γδ con células THP-1 (ATCC-TIB-202) a 1,2x10^6 células/ml y aumento de la concentración de los mAb de prueba (rango de 0,00067 a 67 nM) o la concentración más alta (67 nM) del control de isotipo correspondiente (hIgG1, RSV), diluido en PBS. Las células se incubaron durante 2 horas en una cámara de CO2 humidificada a 37 °C. Las células se lavaron y se tiñeron para detectar células muertas (Thermo Fisher N.° 15580607), TCR VD1 (Miltenyi N.° 130-117-697) y aCD107a (Miltenyi N.° 130-112-610) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador de FACS antes de incubar durante la noche a 4 °C en la oscuridad. El nivel de expresión de TCR VD1 y CD107a, determinado mediante mediana de intensidad de fluorescencia (MFI), se midió mediante citometría de flujo al día siguiente con el MACS Quant Analyzer 16.

Los resultados se muestran en la Figura 13, que muestra que los mAb Vδ1 con maduración de afinidad inducen la activación solo en presencia de las células diana. (A y B) Cuantificación de la expresión de TCR γδ (negro) y expresión de CD107a (gris) después de 2 horas de incubación

de células γδ con ADT1-4-2 solamente (superior) y con células THP-1 (inferior) a una relación diana con respecto a efector de 1:2 antes de la tinción de TCR Vδ1 y CD107a con un TCR -Vδ1 PE-Vio770 y un CD107a-VioBlue, respectivamente. Se adquirió MFI de tinción Vδ1 mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región TCR positiva antes de calcular % de MFI del MFI de células γδ TCR positivas, sin tratar y no cocultivadas. Se adquirió MFI de tinción de CD107a mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región "NO THP-1" antes de calcular % de MFI del MFI de CD107a de células γδ sin tratar no cocultivadas. (C y D) Cuantificación de la expresión de TCR γδ (negro) y expresión de CD107a (gris) después de 2 horas de incubación de células γδ con ADT1-7-3 solamente (superior) y con células THP-1 (inferior) a una relación diana con respecto a efector de 1:2 antes de la tinción de TCR Vδ1 y CD107a con un TCR -Vδ1 PE-Vio770 y un CD107a-VioBlue, respectivamente. Se adquirió MFI de tinción Vδ1 mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región TCR positiva antes de calcular % de MFI del MFI de células γδ TCR positivas, sin tratar y no cocultivadas. Se adquirió MFI de tinción de CD107a mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región "NO THP-1" antes de calcular % de MFI del MFI de CD107a de células γδ sin tratar no cocultivadas. (E) Tabla que representa el aumento de porcentaje en expresión de CD107a γδ a partir de células cocultivadas tratadas con la concentración más alta de mAb Vδ1 en comparación con células γδ no cocultivadas no tratadas. (F) Tabla que representa el aumento de porcentaje en expresión de CD107a γδ a partir de células cocultivadas tratadas con la concentración más alta de mAb Vδ1 en comparación con células γδ no tratadas, cocultivadas y no cocultivadas.

Anticuerpos monoclonales Vδ1 en activación de γδ medida mediante expresión de CD25

La capacidad de mAb ADT para acoplarse con células VD1 γδ y activarlas se evalúa al medir la expresión de CD25. Los linfocitos T γδ de la piel (del donante ATS006) se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 cavidades a 6x10^5 células/ml en un medio γδ con células THP-1 (ATCC-TIB-202) a 1,2x10^6 células/ml y aumento de la concentración de los mAb de prueba (rango de 0,00067 a 67 nM) o la concentración más alta (67 nM) del control de isotipo correspondiente (hIgG1, RSV), diluido en PBS. Las células se incubaron durante 24 horas en una cámara de CO2 humidificada a 37 °C. Las células se lavaron y se tiñeron para detectar células muertas (Thermo Fisher N.° 15580607), TCR VD1 (Miltenyi N.° 130-117-697) y CD25 (Miltenyi N.° 130-113-280) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador de FACS antes de incubar durante la noche a 4 °C en la oscuridad. El nivel de expresión de TCR VD1 y CD107a, determinado mediante mediana de intensidad de fluorescencia (MFI), se midió mediante citometría de flujo al día siguiente con el MACS Quant Analyzer 16.

Los resultados se muestran en la Figura 14, que muestra que los mAb Vδ1 con maduración

de afinidad inducen la activación solo en presencia de las células diana. (A y B) Cuantificación de la expresión de TCR γδ (negro) y expresión de CD25 (gris) después de 24 horas de incubación de células γδ con RSV (agregado a 67 nM) y ADT1-4-2 solamente (superior) y con células THP-1 (inferior) a una relación diana con respecto a efector de 1:2 antes de la tinción de TCR Vδ1 y CD25 con un TCR -Vδ1 PE-Vio770 y un a-CD25-VioBlue, respectivamente. Se adquirió MFI de tinción Vδ1 mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región TCR positiva antes de calcular % de MFI del MFI de células γδ TCR positivas, sin tratar y no cocultivadas. Se adquirió MFI de tinción de CD25 mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región "NO THP-1" antes de calcular % de MFI del MFI de CD25 de células γδ sin tratar no cocultivadas. (A y B) Cuantificación de la expresión de TCR γδ (negro) y expresión de CD25 (gris) después de 2 horas de incubación de células γδ con RSV (agregado a 67 nM) y ADT1-7-3 solamente (superior) y con células THP-1 (inferior) a una relación diana con respecto a efector de 1:2 antes de la tinción de TCR Vδ1 y CD25 con un TCR -Vδ1 PE-Vio770 y un a-CD25-VioBlue, respectivamente. Se adquirió MFI de tinción Vδ1 mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región TCR positiva antes de calcular % de MFI del MFI de células γδ TCR positivas, sin tratar y no cocultivadas. Se adquirió MFI de tinción de CD25 mediante citometría de flujo y se calculó a partir de la región "NO THP-1" antes de calcular % de MFI del MFI de CD25 de células γδ sin tratar no cocultivadas. (E) Tabla que representa el aumento de porcentaje en expresión de CD25 γδ a partir de células cocultivadas tratadas con la concentración más alta de mAb Vδ1 en comparación con células γδ no cocultivadas no tratadas. (F) Tabla que representa el aumento de porcentaje en expresión de CD25 γδ a partir de células cocultivadas tratadas con la concentración más alta de mAb Vδ1 en comparación con células γδ no tratadas, cocultivadas y no cocultivadas.

Regulación descendente de TCR de *Macaca fascicularis*

Los estudios se realizaron para explorar la capacidad de ADT1-4-2 para fijarse a linfocitos T gamma delta vδ1 de *Macaca fascicularis* y para inducir su regulación descendente de TCR. Para estos estudios, los PBMC de *Macaca fascicularis* se recolectaron de sangre fresca y se pusieron en cultivo durante 14 días para expandir linfocitos T γδ. Alternativamente, los linfocitos T αβ se agotaron de la población total de PBMC con microesferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-αβ (Clon R73) antes de expandirse *in vitro*. La expansión fue la siguiente, 250.000 células se agregaron por cavidad de una placa de fondo en U de 96 cavidades en medio RPMI-1640 que contenía 10 % de FCS, antibióticos (P/S) y un cóctel de citocinas (IFNγ, IL21, IL4, IL1β e IL15). Siete días después, las células se enriquecieron con 10 µl de medio fresco que contiene 10 % de FCS, antibióticos (P/S) y las citocinas IL21 e IL15. Se siguió con el reemplazo de 100 µl de medio por medio fresco que contenía 10 % de FCS, antibióticos (P/S) e IL15 el día 11. Al día 14, las células se recolectaron y se sometieron al ensayo de regulación descendente de TCR. Este

ensayo consiste en mezclas las células con diversas concentraciones de anticuerpos durante 2 horas. Luego del tiempo de incubación, las células se tiñeron para el análisis de citometría de flujo para los siguientes marcadores: CD3, TCR-αβ, TCR-γδ y VD1. También se incluyó una tinción de célula viva/muerta para discriminar la población viva de células. El análisis de citometría de flujo se realizó al regular la población celular CD3+, TCR-γδ+ y VD1+ y la media de intensidad de fluorescencia de VD1 se midió dentro de la región VD1+. El control de isotipo (anti-RSV) o ningún anticuerpo se usaron como control negativo solo a la concentración más alta. Los datos se normalizaron al control sin ningún anticuerpo. La **Figura 15 (A)** muestra la comparación de la capacidad de ADT1-4-2 y ADT1-4 para acoplar y reducir la expresión de VD1 en linfocitos T γδ de *Macaca fascicularis*. Los resultados muestran una reducción en respuesta a la dosis de la expresión VD1 tras el tratamiento con ADT1-4-2 (hasta 76 % a 33,3 nM) pero no el anticuerpo ADT1-4. En ese ensayo particular, los linfocitos T γδ se expandieron a partir de una población agotada de linfocitos T αβ. Se usó un rango de 500 veces de concentración. La **Figura 15 (B)** muestra el porcentaje de expresión en superficie celular de VD1 tras el tratamiento con ADT1-4-2. En este ensayo, la expansión de linfocitos T γδ fue a partir de toda la población de PBMC. Se usó un rango de 10.000 veces de concentración. Los datos muestran una reducción de respuesta de dosis de expresión celular VD1 en 2 donantes diferentes (AD8170 y AM945BA) como un ejemplo. Se evaluó un total de 4 donantes y se extrajo EC50 individualmente con la función de curva de ajuste no lineal GraphPad Prism. La **Figura 15 (C)** muestra el valor de EC50 individual para diferentes donantes combinados con la desviación media y estándar. La media es 3,83 ± 2,23 nM.

Anticuerpos:

CD3-AF700 (BD Bioscience, clon SP34-2, ref: 557917)

TCR-αβ-AF647 (BioLegend, clon R73, ref: 201116)

TCR-γδ-BV421 (BioLegend, clon B1, ref: 331218

VD1-PE (eBioscience, clon TS8.2, ref: 12-5679-42)

Citotoxicidad mejorada de clones con maduración de afinidad

La maduración de afinidad de los clones Vδ1 ADT1-4 y ADT1-7 mejora significativamente el efecto citotóxico de los linfocitos T γδ Vδ1 en el ensayo de inactivación de THP-1 *in vitro*

Ensayo de inactivación de células THP-1

Los mAb Vδ1 y el control de IgG anti-RSV se diluyeron a 1 µg/ml en PBS y se diluyeron en serie 1:10 en PBS antes de agregar a placas de ensayo de ultraimagen de 384 cavidades (Perkin Elmer). Las células THP-1 (ATCC) cultivadas en RPMI, 10 % de FCS (Invitrogen) se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace CFSE [0,5 µM] durante 20 minutos. Se separaron linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel expandidos de matraces de cultivo de tejidos y se volvieron a suspender en medio de crecimiento basal antes de mezclar 1:1 con células THP-1 en suspensión. Se

sembraron suspensiones celulares en placas de ensayo de 384 cavidades para obtener una densidad de siembra celular final de 1.000 células THP-1 por cavidad y 2.000 linfocitos T γδ Vδ1 por cavidad. Los mAb se diluyeron en los volúmenes de ensayo final a concentraciones que varían de 200 ng/ml a 0,2 pg/ml. Las células THP-1 y los linfocitos T γδ Vδ1 se cultivaron en presencia de mAb Vδ1 a 37 °C, 5 % de CO_2 durante 24 horas. Para determinar la cantidad de células THP-1 vivas después de 24 horas, se adquirieron imágenes confocales con una plataforma de alto contenido Opera Phenix al capturar nueve campos de visión con un aumento de 10x. Los recuentos de células vivas se cuantificaron en función del tamaño, morfología, textura e intensidad de las tinciones de células vivas.

La Figura 16 muestra que los mAb Vδ1 con maduración de afinidad exhiben potencia mejorada en un ensayo de citotoxicidad de THP-1 de alto contenido en comparación con los clones parentales. **(A** y **B)** Cuantificación de cantidades de linfocitos THP-1 vivos después de 24 horas de cocultivo con linfocitos T γδ en presencia de mAb Vδ1 o controles [Relación efector:diana 2:1]. Las cantidades de células se normalizaron como un porcentaje del control de linfocitos T no γδ (100 %). OKT3 (anticuerpo anti-CD3) y un control de isotipo anti-RSV se incluyeron como controles de ensayo. Las cantidades de células se calcularon mediante microscopía confocal de alto contenido en células vivas. Los gráficos son representativos de los clones ADT1-4 (**A**) y ADT1-7 (**B**) parentales. (**C**) Gráfico de barras que representa el promedio de EC50 del control OKT3 y los clones ADT1-4 y ADT1-7. Los datos se representan como media ±desviación estándar de n=3 replicados biológicos. (**D**) Tabla que resume los EC50 graficados en (**C**). Los datos se representan como media, desviación estándar, relación de cambio y mejora en el porcentaje en comparación con los clones parentales ADT1-4 y ADT1-7.

Anticuerpos monoclonales contra Vδ1 en citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

Se separaron linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel expandidos de tres donantes de matraces de cultivo de tejidos y se volvieron a suspender en medio de crecimiento basal y se sembraron a una densidad final de 20.000 células por cavidad en placas blancas de 96 cavidades. Las células Raji se sembraron de manera similar a 20.000 por cavidad, para usar como un control positivo para ADCC inducido por el anticuerpo Rituximab dirigido a CD20. Los mAb se diluyeron y se agregaron a cada cavidad en las concentraciones finales que variaron de 1 a 100 nM. Se descongelaron las células efectoras del bioensayo FcγRIIIa+ ADD y se agregaron 62.500 células a cada cavidad seguido de incubación a 37 °C, 5 % de CO_2 durante 4,5 horas. El reactivo Bio-Glo que contiene luciferina se agregó a cada cavidad, seguido de una incubación adicional de 10 minutos y la luminiscencia se midió con un lector de placas.

La Figura 17 muestra que los mAb dirigidos a Vδ1 inducen una citotoxicidad celular

dependiente de los anticuerpos (ADCC) insignificante. ADCC, como se mide con un ensayo indicador sustituto en el que la señalización de NFAT corriente abajo se mide por inducción de actividad de luciferasa dentro de las células efectoras FcγRIIIa+. Las células efectoras se cocultivaron con tres donantes de linfocitos T γδ (Relación efector:diana 3) y diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal. Las células Raji $CD20^+$ y Rituximab se incluyeron como un control positivo. La bioluminiscencia se midió después de 4,5 horas de cocultivo. Los datos se representan como media ± SD de tres replicados biológicos (tres donantes de linfocitos T γδ).

Conclusiones: Estos datos demuestran que ADT1-4 parental y el derivado con maduración por afinidad ADT1-4-2 no induce ADCC, que se demuestra a través de la línea celular indicadora efectora FcγRIIIa+ en la que la señalización de NFAT induce la actividad de luciferasa. Sin embargo, OKT3 parece inducir altos niveles de señalización específica de ADCC.

Anticuerpos monoclonales Vδ1 en citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Se separaron linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel expandidos de matraces de cultivo de tejidos y se volvieron a suspender en medio de crecimiento basal y se sembraron a una densidad final de 75.000 células por cavidad en placas blancas de 96 cavidades. Las células Raji se sembraron de manera similar a 75.000 por cavidad, para usar como un control positivo para CDC inducido por el anticuerpo Rituximab dirigido a CD20. Los mAb se diluyeron y se agregaron a cada cavidad en las concentraciones finales que variaron de 1 a 100 nM. El suero humano, ya sea fresco o inactivado por calor, se agregó a una concentración final de 40 %. La inactivación por calor se realizó al calentar el suero en un baño de agua a 56 °C durante 30 minutos, seguido de enfriamiento en hielo. Los cultivos luego se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 durante 24 horas. Para determinar las cantidades de células vivas después de 24 horas, las células se recolectaron y se tiñeron con tinte de viabilidad xx en una dilución de 1:1000 durante 20 minutos. La fluorescencia se midió con el MACSQuant y los recuentos de células vivas se cuantificaron en función de la tinción negativa para el tinte de viabilidad.

Los resultados se muestran en la Figura 18, que demuestra que los mAb dirigidos a Vδ1 no inducen la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La cantidad de linfocitos T γδ viables seguidos de cultivos con 40 % de suero humano y 50 nM de OKT3 anti-CD3 o ADT1-4-2 anti-Vδ1 y diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal. El suero se usó fresco o se sometió a inactivación por calor previa Las células Raji $CD20^+$ y Rituximab se incluyeron como un control positivo. La viabilidad se midió después de 24 horas de cocultivo a través de tinte de viabilidad. Los datos se representan como media ± SD de tres replicados.

Conclusiones: Los datos demuestran que ADT1-4-2 no induce citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), sin aumento en la citotoxicidad de células Vδ1-positivas en presencia de

suero que contiene complementos. Sin embargo, Rituximab muestra fuerte estimulación de CDC contra las células Raji CD20-positivas.

Preservación de células sanas

Los estudios se realizaron para explorar el efecto de estimular/activar las células vδ1 con anticuerpo anti-vδ1 con respecto a la citotoxicidad hacia las células sanas. Esto se evaluó al incubar el clon anti-vδ1 ADT1-4-2 con PBMC y luego evaluar la citotoxicidad y apoptosis de monocitos.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana criopreservada obtenidas de 3 donantes sanos. Las PBMC se sembraron en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 cavidades a 250.000 células/cavidad en 250 ul de medio completo (RPMI suplementado con 10 % de FCS, pen/estrep, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y HEPES) con 10 ng/ml de IL15. Un anticuerpo vδ1 de titulación ADT1-4-2 se agregó a una concentración final de 6,6 nM. Los anticuerpos RSV IgG, IgG2α y OKT3 se incluyeron como controles. Las estimulaciones se realizaron durante 20 horas. El análisis de citometría de flujo se realizó en el punto final para determinar el fenotipo de monocito en cada condición y monocitos apoptóticos en células vδ1. Las células se regularon primero en singuletes vivos, seguido de CD14 (Miltenyi 130-110-523) para identificar monocitos. Los monocitos apoptóticos luego se identificaron a través de tinción positiva ApoTracker Green (Biolegend 427402).

La Figura 19A (panel superior izquierdo) muestra MFI de tinción de TCR vδ1 tras la estimulación de anticuerpos como una indicación de acoplamiento diana. Las Figuras 19B (panel superior derecho) y 19C (panel inferior) muestran el fenotipo de monocito final y monocitos apoptóticos (respectivamente) tras la estimulación de anticuerpos. La estimulación del clon vδ1 de anticuerpos ADT1-4-2 acopló las células vδ1, pero no causó citotoxicidad de monocitos sanos.

EJEMPLO 6. EFECTO DE ANTICUERPOS ANTI-Vδ1 SOBRE POBLACIONES DE TIL DE BIOPSIAS DE TUMORES PRIMARIOS.

El anticuerpo anti-Vδ1 promovió activación, proliferación y citotoxicidad en linfocitos que infiltran tumores.

Se realizaron estudios para explorar la modulación de linfocitos que infiltran tumores (TIL) humanos conferida por anticuerpo anti-Vδ1. Para estos estudios, se enviaron biopsias tumorales frescas de carcinoma de células renales (RCC) humano y se las procesó una vez recibidas. Las biopsias se cortaron en trozos que medían ~2mm^2 y se obtuvieron los TIL con una adaptación del método descrito originalmente por Kupper y Clarke (Clarke *et al*, 2006). Específicamente, hasta cuatro biopsias de 2mm^2 se colocaron en matrices de Cellfoam de 9 mm x 9 mm x 1,5 mm y se colocó una matriz por cavidad en una placa de 24 cavidades. Las biopsias luego se cultivaron en 2 ml de medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) suplementado con 4 % de plasma

humano, β-mercaptoetanol (50 µM), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), anfotericina B (2,5 µg/ml), HEPES (10 mM), Na piruvato (1 mM), solución de aminoácidos no esencial MEM (1X) e IL-15 (2 ng/ml, Miltenyi Biotech). Se aspiró 1 ml de medio cada 3-4 días y se reemplazó con 1 ml de medio completo que contiene IL-15 2x concentrado. Los TIL se recolectaron 10 u 11 días más tarde, se pasaron a través de un colador celular de nylon de 70 µM, se centrifugó a 300 xg durante 5 minutos y se volvieron a suspender en medio completo para el recuento. Luego, se colocaron en placas 400.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades antes de la estimulación con anticuerpos anti-Vδ1 Los TIL se estimularon con anticuerpos ADT1-4, ADT1-4-2, ADT1-7-3 o control de isotipo RSV IgG1 en presencia de IL-15 a una concentración de 2 o 50 ng/ml.

La **Figura 20 (A y B)** muestra el % de disminución en expresión de TCR Vδ1 en los linfocitos T γδ que infiltran tumores totales después de 48 (A) o 72 (B) horas de estimulación de mAb en dos donantes separados, lo que confirma el acoplamiento de la diana en cada caso. Se analizó la expresión de CD25 y Ki67 de las células $V\delta1^+$ que infiltran tumores. La **Figura 20 (C)** muestra la expresión mejorada de CD25 y Ki67 en linfocitos T Vδ1+ después de 48 horas de estimulación con ADT1-4-2 en comparación con estimulación con control de isotipo de IgG1 o ADT1-4. Se analizó la producción de citocina de los sobrenadantes a partir de cultivos de TIL estimulados con mAb mediante MSD. La **Figura 20 (D)** muestra sustanciales aumentos en veces de la producción de IFN-γ y TIL estimulados con ADT1-4-2 o ADT1-7-3 durante 72 horas en presencia de 50 ng/ml de IL-15. La **Figura 20 (E)** muestra que la estimulación de TIL con ADT-1-4-2 o ADT1-7-3 no mejoró la secreción de citocinas asociadas al tipo 17 IL-6 o IL-17 en este punto temporal.

Alternativamente, las biopsias de diferentes donantes se digirieron enzimáticamente una vez recibidas para obtener una única suspensión celular. Específicamente, se colocó hasta 1 g de tejido en cada tubo C de Miltenyi junto con 4,7 ml de RPMI y enzimas del kit de disociación tumoral de Miltenyi a concentraciones recomendadas por el fabricante, además de la enzima R, que se usó a una concentración de 0,2X para impedir la escisión de las moléculas pertinentes de la superficie celular. Se colocaron tubos C en el gentleMACS™ Octo Dissociator con bloques calentadores adjuntos. Se seleccionó el programa 37C_h_TDK_1 para la disociación de los tumores pequeños. Después de 1 hora, se filtró lo digerido a través de un filtro de 70 µM y se agregó IMDM completo que contenía 4 % de plasma humano para inactivar la actividad enzimática. Luego las células se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en IMDM completo para el recuento. Según las cantidades de células, $2x10^6$ o $4x10^6$ células se colocaron en placas por cavidad en placas de 48 cavidades y se estimularon con anticuerpos ADT1-4, ADT1-4-2 o control de isotipo RSV IgG1 en presencia de IL-15 a una concentración de 2 ng/ml. Los TIL aislados por digestión enzimática se

analizaron mediante citometría de flujo 24-72 horas después de la estimulación de mAb. La **Figura 20 (F y G)** muestra el % de disminución en expresión de TCR Vδ1 en linfocitos T γδ que infiltran tumores totales después de estimulación con mAb en 24 (F) o 72 (G) horas en dos donantes individuales, lo que confirma el acoplamiento de la diana en TIL aislados mediante digestión enzimática. La **Figura 20 (H)** muestra la expresión mejorada dependiente de la dosis de Ki67 en linfocitos T γδ después de 72 horas de estimulación con ADT1-4-2. Se analizaron los sobrenadantes de cultivos de TIL estimulados con mAb para determinar la producción de citocina mediante MSD. La **Figura 20 (I y J)** muestra el aumento en veces de IFN-γ producida por TIL aislados a partir de dos donantes individuales mediante digestión enzimática y estimulados con ADT1-4-2 a una concentración de 6,66 nM en presencia de 2 ng/ml de IL-15 en dos puntos temporales, 24 horas (I) y 72 horas (J). En resumen, estos resultados combinados resaltan la capacidad del anticuerpo anti-Vδ1 con maduración de afinidad para impulsar la activación, proliferación y producción de citocinas anti-tumorigénica mediante linfocitos T γδ que infiltran tumores dentro de las 72 horas de estimulación.

En otro experimento, los TIL derivados de tumor de pulmón se aislaron en matrices de red y estimularon con ADT1-4, ADT1-4-2 o control de isotipo de IgG1 durante 10 días en presencia de 2 ng/ml de IL-15. La **Figura 21 (A)** muestra la expresión mejorada de CD25 y Ki67 en linfocitos T γδ estimulados durante 10 días con ADT1-4-2. La **Figura 21 (B)** muestra un aumento sustancial en linfocitos T γδ granzima B^+ perforina$^+$ después de 10 días de estimulación con ADT1-4-2. La estimulación con mAb durante un período de tiempo más largo permitió el análisis de la licencia inmunitaria de linfocitos T αβ a través de linfocitos T $Vδ1^+$ estimulados por anticuerpos anti-Vδ1. La **Figura 21 (C)** muestra expresión considerablemente mejorada de granzima B y perforina por linfocitos T αβ $CD8^+$ y $CD8^-$ después de 10 días de estimulación de linfocitos T $Vδ1^+$ que infiltran tumores con ADT1-4-2. Se analizaron los sobrenadantes de TIL cultivados durante 10 días con mAb mediante MSD. La **Figura 21 (D)** muestra producción significativamente aumentada de IFN-γ, y producción moderadamente aumentada de IL-17 y IL-6 por TIL derivados de tumor de pulmón después de estimulación con ADT1-4-2. La **Figura 21 (E)** demuestra la producción mejorada de las quimiocinas CCL2, CCL4 y CXCL10 mediante TIL después de 10 días de estimulación con ADT1-4-2. En resumen, estos resultados resaltan la capacidad del anticuerpo anti-Vδ1 para impulsar la activación y citotoxicidad en los linfocitos T γδ que infiltran tumores, que luego pueden promover la citotoxicidad en los linfocitos T αβ que infiltran tumores.

EJEMPLO 7. Afinidad de fijación de anticuerpo biespecífico Vδ1-EGFR a Vδ1 humano y antígeno de EGFR humano

La afinidad de fijación de los anticuerpos a la diana (es decir, la cadena Vδ1 de un TCR γδ y EGFR) se establece mediante análisis SPR con un instrumento Reichert 4SPR (Reichert

Technologies). El anticuerpo (1,5 ug/ml) se recubre sobre un chip sensor de proteína A plana (Reichert Technologies) para obtener un aumento al inicio de aproximadamente 500 uRIU. El heterodímero Vδ1 humano recombinante o EGFR humano se pasó por encima de la célula a una concentración de 100 nM con los siguientes parámetros: 180 s de asociación, 480 s de disociación, velocidad de flujo 25 µl/min, amortiguador de corrida PBS + 0,05 % de Tween 20. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la Figura 26A y 26B.

Conclusiones: Estos datos demuestran que los anticuerpos biespecíficos Vδ1/EGFR presentan una fijación a Vδ1 humano que es comparable a la de los anticuerpos anti-Vδ1 monoespecíficos usados en su preparación, independientemente de la introducción de capacidad de fijación a EGFR humano.

EJEMPLO 8. Fijación de células diana de los anticuerpos biespecíficos Vδ1-EGFR

Las células A431 EGFR positivas y los linfocitos T γδ Vδ1 positivos primarios se sometieron a ensayo para determinar la especificidad y afinidad de la fijación de anticuerpo biespecífico EGFR/Vδ1. Las células diana se separaron del matraz de cultivo de tejidos, se volvieron a suspender en PBS y se sembraron a una densidad final de 100.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades de fondo en forma de v. Las células se sometieron a centrifugación y los pélets celulares se volvieron a suspender en reactivo de bloqueo de FcR de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C antes de un lavado adicional. Los anticuerpos se diluyeron hasta 500 nM en PBS y se diluyeron en serie 1:10 en PBS hasta 50 pM, y se agregaron a las células, seguido de una incubación de 20 minutos a 4 °C. Para determinar la cantidad de mAb que se fija a la superficie celular, las células se tiñeron luego con un anticuerpo secundario anti-IgG humana murino, conjugado con APC (dilución: 1:100), además de un tinte de viabilidad. Tras 20 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavaron dos veces y la fluorescencia se midió con el MACSQuant. Los resultados se muestran en la Figura 27.

Conclusiones: Estos datos demuestran que los anticuerpos biespecíficos Vδ1/EGFR presentan una fijación a linfocitos T γδ Vδ1 positivos que es comparable a la de los anticuerpos anti-Vδ1 monoespecíficos usados en su preparación, independientemente de la introducción de fijación a la línea celular A431 EGFR positiva.

EJEMPLO 9. Evaluación de la activación de linfocitos T γδ y citotoxicidad de células diana *in vitro*

Se separaron linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel expandidos y células A431 de matraces de cultivo de tejidos y se volvieron a suspender en medio de crecimiento basal y se sembraron en placas de 96 cavidades en las diluciones de células relevantes en función de la relación efector:diana deseada. Los mAb se diluyeron y se agregaron a cada cavidad en la

concentración especificada. Los cultivos luego se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 durante 4 horas (D) o 24 horas (A-C, E). Para determinar las cantidades de células vivas, las células se recolectaron y se tiñeron con tinte de viabilidad en una dilución de 1:1000 durante 20 minutos. Para determinar el estado de CD25, las células se tiñeron en la superficie con un anticuerpo anti-CD25 después de la recolección de células. Para medir la desgranulación, el anticuerpo anti-CD107α conjugado con fluoróforo se agregó directamente en la mezcla de células-anticuerpo al inicio del cocultivo. Después de dos lavados y fijación de células, la fluorescencia se midió con el MACSQuant y se determinaron los recuentos de células vivas y la mediana de intensidad de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 28.

Conclusiones: Estos datos demuestran que los anticuerpos biespecíficos Vδ1/EGFR inducen la activación y desgranulación de linfocitos T γδ Vδ1 positivos primarios que lleva a una mayor lisis mediada por células de línea celular A431 EGFR positiva.

EJEMPLO 10. Evaluación adicional de los efectos de activación y no agotamiento de los linfocitos T γδ conferidos por los anticuerpos de la presente invención

Los estudios se realizaron para explorar el efecto de estimular/activar las células vδ1 con anticuerpo anti-vδ1 con respecto a la regulación descendente de CD3 en células vδ1. Esto se evaluó al incubar el clon ADT1-4-2 anti-vδ1 con PBMC y luego evaluar el TCR por fenotipo.

Se obtuvieron en el comercio células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana criopreservada y se sembraron en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 cavidades a 250.000 células/cavidad en 250 ul de medio completo (RPMI suplementado con 10 % de FCS, pen/estrep, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y HEPES) con 10 ng/ml de IL15. Un anticuerpo vδ1 de titulación ADT1-4-2 se agregó a una concentración final de 1 ug/ml (6,67 nM), 0,01 ug/ml (0,067 nM) o 0,0001 ug/ml (0,00067 nM). El anticuerpo IgG RSV se incluyó como un control en una concentración emparejada. Los cultivos se incubaron durante 14 días, con medio y anticuerpo reabastecido cada 3 días. El análisis de citometría de flujo se realizó en el punto final para determinar el fenotipo de las células vδ1 y la expresión de TCR en cada condición. Las células se regularon primero en singuletes vivos, seguido de panγδ (Miltenyi REA592; 130-113-508), que fue la regulación parental para vδ1 (Miltenyi REA173; 130-100-553), que fue la misma regulación parental para CD3 (Miltenyi REA613; 130-113-142). Las poblaciones de células se identificaron a través de tinción positiva y luego el nivel relativo de expresión de cada marcador entre las muestras a través del MFI.

La **Figura 29A** muestra el MFI de TCR vδ1 tras la estimulación de anticuerpos como una indicación de acoplamiento diana de mAb. La **Figura 29B** muestra el MFI de expresión de CD3 en células vδ1 reguladas positivamente. La estimulación con el clon de anticuerpo vδ1 ADT1-4-2 se acopló con células vδ1 y dio como resultado la regulación descendente de vδ1 y CD3 en células

vδ1.

EJEMPLO 11: Los anticuerpos Anti-vδ1 no inducen ADCC.

Se usó un bioensayo indicador de ADCC (Promega) para evaluar el nivel de ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo) inducida por anticuerpos anti-vδ1 en comparación con anticuerpos de control.

ADCC se refiere al fenómeno biológico mediante el cual las células efectoras inactivan las células diana que se etiquetan mediante anticuerpos. Las células efectoras se fijan a los anticuerpos a través de sus receptores de Fcy y posteriormente inactivan la célula diana. El bioensayo indicador de ADCC presentado aquí descubre los mecanismos potenciales de ADCC de acción de anticuerpos que se evalúan dentro del ensayo, al detectar la iniciación temprana de ADCC a través de la activación de transcripción de genes a través de la vía NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados). El ensayo indicador es un sistema diseñado por ingeniería genética que utiliza células efectoras (Jurkat) que expresan receptor FcγRIIIa de alta afinidad unido a la vía NFAT que está adicionalmente diseñada por ingeniería genética para que, al activarla, induzca la actividad adicional de la enzima de luciferasa de luciérnaga. La actividad de luciferasa se cuantifica con una lectura de luminiscencia que se puede correlacionar con los niveles de ADCC que tienen lugar.

Este ensayo se utiliza para entender si los anticuerpos anti-vδ1 o, de manera adecuada, el brazo anti-vδ1 de anticuerpos multiespecíficos, impulsarían una reacción de ADCC. Las células diana usadas fueron células γδ que se fijan al anticuerpo anti-vδ1 a través del TCR γδ vδ1. Si existe un mecanismo de acción de ADCC, el anticuerpo anti-vδ1 se uniría a los receptores de Fcy en las células efectoras de ensayo y generaría una señal de luminiscencia; si no se genera una señal, esto sugeriría que no ocurre ADCC.

El kit de bioensayo indicador de ADCC (Promega) se usó para este ensayo. Se descongeló una botella de amortiguador de ensayo de luciferasa Bio-Glo y se transfirió a la botella de sustrato. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 4-6 horas. Una placa de dilución se preparó con concentraciones de anticuerpos (a 3X de concentración) que variaban de 10 nM a 0,01 nM (concentración final) para los siguientes anticuerpos: anticuerpo anti-vδ1 (ADT1-4-2), mismo anticuerpo anti-vδ1, pero deshabilitado por Fc (L235A, G237A) (ADT1-4-2 LAGA), Rituximab, RSV y OKT3. Las células diana (células γδ) se sembraron en las 2 placas de ensayo a 25 µl por cavidad. Luego, 25 µl de la solución de anticuerpo adecuada de la placa de dilución de anticuerpo se transfirió a la cavidad adecuada. Las células efectoras (células Jurkat diseñadas por ingeniería genética) se descongelaron en amortiguador de ensayo caliente, se volvieron a suspender en 4 ml del amortiguador de ensayo y se pipeteó 25 µl de la solución de células efectoras en cada cavidad. Luego las placas se incubaron a 37 °C durante 4,5 horas. Después del

período de incubación, se permitió que las placas se equilibraran a temperatura ambiente, después de lo cual se agregaron 75 µl de reactivo de ensayo de luciferasa Bio-Glo a cada cavidad y las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego las placas se leyeron con un lector de placas Biotek H4 que recolectó las señales de luminiscencia (como unidades de luz relativa RLU) de las placas. Se calculó la inducción en veces con la siguiente ecuación: Plegamiento de inducción = RLU (inducido–antecedentes) /RLU (sin control de anticuerpo–antecedentes).

Como un control positivo, se usó OKT3 (anticuerpo anti-CD3). Como un control positivo adicional, se sembraron células Raji en lugar de células γδ en las cavidades de control. Las células Raji son una línea celular que se suele aceptar para demostrar una fuerte reacción de ADCC cuando se usa con el anticuerpo anti-CD20, Rituximab. Como un control interno y para comprender si los anticuerpos anti-vδ1 impulsan ADCC en ausencia de fijación de vδ1 sobre células γδ, los anticuerpos anti-vδ1 de esta invención y los mismos anticuerpos anti-vδ1, pero deshabilitados por Fc, L235A, G237A) también se agregaron con las células efectoras solas.

Los resultados se muestran en la **Figura 30**.

Conclusiones: Se mostró una fuerte reacción de ADCC en el control positivo con Rituximab con células Raji y se demostró una reacción de ADCC aún más fuerte con OKT3 contra células γδ. En contraste, no se detectó ninguna reacción de ADCC en las condiciones con los anticuerpos anti-vδ1 de esta invención, los mismos anticuerpos anti-vδ1, pero también el L235A, G237A o control negativo RSV deshabilitado por Fc. Esto demuestra que, en este sistema, los anticuerpos de esta invención que se fijan a vδ1 (tales como mAb anti-vδ1 o anticuerpos multiespecíficos anti-vδ1) no muestran evidencia de un mecanismo de acción de ADCC. Notablemente, incluso los anticuerpos anti-Vδ1 habilitados por Fc no agotan los linfocitos T γδ, lo que proporciona la opción de mantener la función de Fc en los anticuerpos anti-Vδ1 presentados en la presente, lo que agrega funcionalidad, por ejemplo, en entornos tumorales de Fcy altos. Esto resalta además la idoneidad de dichos anticuerpos anti-Vδ1 para la inclusión en formatos de anticuerpo biespecíficos como se describe en la presente.

EJEMPLO 12: Evaluación de la capacidad de elaboración/estabilidad de anticuerpos multiespecíficos Vδ1xEGFR

Para entender mejor la capacidad de elaboración/estabilidad de las moléculas multiespecíficas Vδ1xEGFR novedosas descritas en la presente, los inventores evaluaron un panel de estas moléculas con diversos métodos. Los estudios revelaron diferencias sorprendentes que se describen a continuación.

ta

(A) Rendimientos en CHO

Método: Los anticuerpos multiespecíficos se produjeron en primer lugar en una plataforma de expresión en CHO estándar ("Plataforma de CHO 1"). Esta plataforma comprende vectores de expresión estándar que contienen casetes de las cadenas pesada y liviana. Se emplearon células CHO K1 adaptadas a la suspensión (originalmente de ATCC y adaptadas a crecer libres de suero en cultivo de suspensión) para la elaboración. Las células semilla se cultivaron en un medio libre de suero y de componentes animales químicamente definido. Las células luego se transfectaron con vectores y reactivo de transfección, y las células se cultivaron adicionalmente. El sobrenadante se recolectó mediante centrifugación y el anticuerpo se purificó mediante el uso de MabSelect™ SuRe™ antes de la formulación.

Conclusiones: Los rendimientos comparativos para las dos moléculas expresadas en esta plataforma se indican en la Figura 34A y resaltan la expresión y recuperaciones superiores observadas para ADT1-4-2xLEE en comparación con ADT1-4-2xFS1-67 (indicado por una flecha). Luego, se realizó una comparación adicional en una plataforma de CHO alternativa ("Plataforma de CHO 2"). En esta plataforma alternativa, los rendimientos de cada molécula fueron más comparables.

(B) Estabilidad en condiciones de almacenamiento acelerado

Método: Los anticuerpos producidos en la "Plataforma de CHO 2" anterior luego se formularon en un amortiguador típico de formulación de anticuerpos a 2 mg/ml y se estudiaron en condiciones de estrés acelerado (37 °C). Las moléculas luego se analizaron mediante métodos de icIEF estándar con la plataforma Uncle y protocolos estándar (Unchained Labs, CA, EE. UU.).

Conclusiones: La Figura 34B muestra que, si bien la mayoría de las moléculas parecía relativamente estable, se observó un marcado aumento de una especie básica después de solo 48 horas en el caso de la molécula ADT1-4-2xFS1-67 (indicado por una flecha). No se observó tal aumento en el caso de otras moléculas, como se ejemplifica con la molécula ADT1-4-2xLEE en la Figura 34B. Este hallazgo demuestra que la molécula ADT1-4-2xLEE es un anticuerpo multiespecífico Vδ1xEGFR más estable (por ejemplo, más estable térmicamente). Dado que las únicas diferencias de secuencia entre ADT1-4-2xFS1-67 y ADT1-4-2xLEE están en las posiciones L358.T359.K360, esto sugiere que, en algunos casos, un anticuerpo multiespecífico Vδ1xEGFR que comprende al menos un primer dominio de fijación derivado de anticuerpo dirigido a la cadena Vδ1 de un TCR γδ y un segundo dominio de fijación fijado al receptor de EGF y que comprende L358.E359E.E360 es una variante de mayor preferencia en comparación con un biespecífico Vδ1xEGFR que comprende en su lugar T358.D359.D360 en estas posiciones (todas las numeraciones de acuerdo con EU).

(C) Propensión a la agregación

Método: El perfil de fusión de los anticuerpos multiespecíficos se evaluó con Uncle y

protocolos estándar (Unchained Labs, CA, EE. UU.).

Conclusiones: La Figura 34C resalta que, en el caso de la molécula ADT1-4-2xFS1-65, el inicio de la agregación se produjo antes de la fusión, lo que dio como resultado un delta significativo (indicado por una flecha). Esto se diferenció de la otra molécula, en donde el inicio de la agregación fue más concurrente con el inicio de la fusión. Una concurrencia de la fusión/agregación es por lo general un indicio de una molécula más estable.

(D) Perfil de descomposición a mayores concentraciones en condiciones aceleradas (análisis no reducido).

Método: Si bien los estudios que investigaban la propensión a la agregación a 2 mg/ml no revelaron diferencias significativas, los estudios a 5 mg/ml (en condiciones aceleradas, 18 días a 37 °C) revelaron cambios marcados en las diferentes moléculas cuando se las analizó mediante CE-SDS no reductora con Maurice y protocolos estándar (Unchained Labs, CA, EE. UU.).

Conclusiones: Con tal análisis se observaron aumentos significativos en la aparición de impurezas no monoméricas en varias de las moléculas biespecíficas analizadas (pero no en todas). En la Figura 34D se presentan resultados de ejemplo y resultados resumidos en forma tabulada de este estudio (los cambios notables están indicados por flechas).

(E) Perfil de descomposición a concentraciones altas en condiciones aceleradas (análisis reducido).

Si bien los estudios en (D) más arriba resaltan que ADT1-4-2xFS1-67 exhibió un perfil más estable en condiciones aceleradas cuando se la analizó en condiciones no reductoras, cuando se la analizó en condiciones de CE-SDS reductora (nuevamente con Uncle y protocolos estándar, Unchained Labs, CA, EE. UU.), esta misma molécula ADT1-4-2xFS1-67 exhibió un perfil particularmente atípico en comparación con las otras moléculas multiespecíficas ejemplificadas en la Figura 34E mediante ADT1-4-2xLEE. No se observa que ADT1-4-2xLEE presente un mayor "*shouldering*" después de 18 días a 37 °C (lo cual es específico solo de ADT1-4-2xFS1-67), lo cual puede sugerir propiedades más favorables para ADT1-4-2xLEE.

EJEMPLO 13: Aumento/disminución de la afinidad en el brazo de fijación a VD1 de anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR.

En estos estudios, se creó una serie de anticuerpos multiespecíficos en donde

(i) la afinidad con Vδ1+ se aumentó/disminuyó entre alrededor de 0,2 nM y 20 nM mientras que

(ii) la afinidad con EGFR se mantuvo constante a alrededor de 1 nM.

Los efectos de estas moléculas se estudiaron luego en una serie de experimentos. También se incluyó una molécula multiespecífica D1.3 x EGFR de control en esta serie de estudios. Este control comprendía un primer dominio de fijación de mAb D1.3, que se fija a

lisozima de pollo (en lugar de TCR Vδ1), y un segundo dominio de fijación, que se fija a EGFR con una afinidad de alrededor de 1 nM.

(A) Resumen de afinidad.

Se presentan la nomenclatura y la afinidad de este panel de moléculas multiespecíficas.

Método de SPR para el ejemplo 13: La afinidad de fijación de los anticuerpos a la diana (Vδ1 humano) se estableció mediante análisis SPR con un instrumento 4SPR (Reichert Technologies). Los anticuerpos (1,5 ug/ml) se colocaron a modo de recubrimiento sobre un Planar Protein A Sensor Chip (Reichert Technologies) para obtener un aumento al inicio de aproximadamente 500 uRIU. Se pasó antígeno Vδ1 humano por encima de la célula en una serie de dilución de 1:3 con concentraciones máximas de 50 nM con los siguientes parámetros: 180 s de asociación, 900 s de disociación, velocidad de flujo 25 µl/min, amortiguador de corrida PBS + 0,05 % de Tween-20. La superficie del chip se regeneró con ácido fosfórico 20 mM tras cada inyección. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. El ajuste de estado estacionario se determinó de acuerdo con una fijación de Langmuir 1:1 mediante el uso del *software* TraceDrawer (Reichert Technologies).

(B)(C) Impacto de la afinidad con TCR vδ1 sobre la fijación multiespecífica a células Vδ1+ que residen en el tejido.

En este primer experimento con este panel de moléculas, se investigó la función de la afinidad con el TCR Vδ1.

Método: Se coincubaron células efectoras Vδ1+ derivadas de tejido cutáneo con anticuerpos que se diluyeron en serie en PBS hasta un rango de concentraciones de 10 nM a 0,13 pM. Las células se incubaron durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron y se tiñeron con un anticuerpo secundario anti-Fc humano (Jackson Immunoresearch) y un tinte de viabilidad para detectar células muertas (eFlour 780, Invitrogen) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de analizarlas en un citómetro de flujo MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi).

Conclusiones: Los datos de fijación presentados sugieren una correlación fuerte entre una mayor afinidad con Vδ1 y un mayor nivel de fijación de anticuerpo multiespecífico a células Vδ1+ que residen en el tejido. Ver la Figura 35B y la Figura 35C, que muestra los resultados tabulados de la Figura 35B. Estos datos resaltan que las moléculas con mayor afinidad confieren efectos potenciados a concentraciones de saturación. Notablemente, los efectos conferidos por las variantes con mayor afinidad no pueden imitarse o recapitularse con concentraciones mayores de variantes con menor afinidad de los anticuerpos. Esto sugiere que las moléculas con una afinidad (anormalmente) alta con el TCR Vδ1 confieren efectos diferentes que las moléculas con menor afinidad son incapaces de imitar, incluso a concentraciones significativamente mayores (por

ejemplo, 100 veces). Este descubrimiento también se analiza adicionalmente en la presente.

Luego se estudiaron efectos adicionales de estas moléculas en la siguiente serie de experimentos. Se coincubaron células efectoras Vδ1+ derivadas de tejido cutáneo con una línea de células cancerosas de melanoma A375 EGFR+ de la siguiente manera:

- En primer lugar, se sembraron células diana EGFR+ en placas para cultivo de tejidos de cavidades múltiples ~16 horas antes de preparar el ensayo.
- Al día siguiente, los anticuerpos se diluyeron en serie hasta un rango de concentraciones en crecimiento basal antes de agregarlos a células diana EGFR+.
- Se separaron linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel de matraces de cultivo y se sembraron suspensiones celulares en placas de ensayo, y los cocultivos se incubaron durante la duración especificada a 37 °C, 5 % de CO2.
- Las células se procesaron y analizaron en función de la lectura seleccionada, como se describe en cada caso.

Los resultados de estos estudios se presentan de la siguiente manera:

(D)(E) Impacto de la afinidad con TCR vδ1 sobre la internalización de TCR Vδ1 de células Vδ1+ que residen en el tejido.

En este primer análisis en donde las células efectoras Vδ1+ se coincuban con células cancerosas EGFR+, el foco está puesto sobre la inducción de la internalización de TCR Vδ1 tras el acoplamiento con el anticuerpo multiespecífico.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 2,5x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 2,5x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, los linfocitos T γδ Vδ1 se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 µM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de anticuerpos de ensayo variaron de 10 nM a 0,13 pM. Tras incubarlas durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO2, las células se recolectaron y se tiñeron para detectar las células muertas (eFlour 780, Invitrogen) y la expresión superficial de TCR Vδ1 (MiltenyiBiotec) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de analizarlas en un citómetro de flujo MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi).

Conclusión: La reducción en MFI se presenta en la Figura 35D. Estos resultados son indicativos de una mayor regulación descendente de TCR tras el acoplamiento con el anticuerpo. También se descubrió que, a mayor afinidad, mayor la reducción de la señal de MFI (y por ende de la regulación descendente de TCR). Notablemente, incluso cuando se agregó 100 veces más de la molécula con menor afinidad (ADT1-4-138xADT3-2), no se pudo inducir una reducción equivalente de señal. Esto sugiere una afinidad anormalmente alta con la diana de TRDV1 que puede potenciar adicionalmente la regulación descendente de TCR. También sugiere que una fijación con

afinidad muy alta confiere diferentes efectos sobre la función de TCR. Solo se puede especular acerca de por qué se necesitan tales altas afinidades para lograr efectos más óptimos de regulación descendente saturadora. Es posible que este sea un efecto estocástico sobre una población Vδ1+ homogénea en donde un mayor tiempo de residencia (mediante una constante de disociación reducida) de las moléculas con mayor afinidad confiere mayores efectos de saturación, posiblemente a través de niveles mayores de reticulación de TCR. Una alternativa posible es que un subconjunto de células Vδ1+ sea resistente a los efectos de regulación descendente de TCR conferidos por las moléculas con menor afinidad. Se presenta un resumen de los hallazgos de la Figura 35D en forma tabulada (ver la Figura 35E). Esto resalta adicionalmente el hecho de que una alta afinidad proporciona diferentes efectos a concentraciones de saturación y que el efecto reducido conferido por moléculas con menor afinidad no puede compensarse con una dosificación a mayores concentraciones.

(F)(G) Impacto de la afinidad con TCR vδ1 sobre la desgranulación de células Vδ1+ que residen en el tejido.

El siguiente análisis se enfoca en los efectos de desgranulación conferidos por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 2,5x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 2,5x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, los linfocitos T γδ Vδ1 se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 µM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de anticuerpos multiespecíficos de ensayo variaron de 10 nM a 0,13pM. Además, se agregó un anticuerpo conjugado con fluoróforo específico para CD107a (MiltenyiBiotec) al comienzo de la coincubación. Tras incubarlas durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO2, las células se recolectaron y se tiñeron para detectar las células muertas (eFlour 780, Invitrogen) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de analizarlas en un citómetro de flujo MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi). Ver la Figura 35F.

Conclusiones: Estos estudios demuestran nuevamente que una mayor afinidad confiere efectos óptimos. Se observa una correlación directa entre una mayor regulación ascendente de CD107a y una mayor afinidad. Nuevamente, estos datos sugieren que afinidades anormalmente altas con el TCR Vδ1 impulsan efectos notablemente diferentes y más favorables que no pueden recrearse con moléculas con una menor afinidad con Vδ1, incluso con dosis a concentraciones mucho mayores. Los resultados resumidos de la Figura 35F se presentan en forma tabulada. (Ver la Figura 35G) Nuevamente, este resumen resalta el descubrimiento de que las moléculas con mayor afinidad a concentraciones de saturación confieren efectos de saturación diferentes y más

mejorados en comparación con una molécula con menor afinidad, incluso cuando se la emplea a concentraciones mucho mayores.

(H)(I) Impacto de la afinidad con TCR vδ1 sobre la función citolítica multiespecífica hacia células cancerosas EGFR+.

El siguiente análisis se enfoca en el efecto citolítico conferido por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 4x10^3 linfocitos T γδ Vδ1 a 4x10^3 células diana EGFR+ por cavidad en placas CellCarrier Ultra de 384 cavidades (PerkinElmer). Las concentraciones finales de anticuerpos de ensayo variaron de 5 nM a 0,03 pM. Tras incubarlas durante 24 horas a 37 °C, 5 % de CO2, las células se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen) y para detectar las células muertas (DRAQ7, Abcam) durante 1 hora a 37 °C. Se obtuvieron imágenes de las células en un sistema Opera Phenix (PerkinElmer) y se determinó la cantidad de células diana viables con un modelo de regresión lineal (Harmony 4.9) en función del tamaño, morfología, textura e intensidad de las tinciones de células vivas y la ausencia de tinción de DRAQ7.

Conclusión: Los datos presentados aquí demuestran que las moléculas con la afinidad más alta con Vδ1 son las más potentes y citolíticas hacia las células cancerosas EGFR+. Ver la Figura 35H. Además, se observaron diferencias cualitativas entre el anticuerpo multiespecífico con la menor afinidad con Vδ1 (20 nM) y los anticuerpos multiespecíficos con una afinidad media/alta con Vδ1 (1,2 nM y 0,2 nM respectivamente), en donde se observaron efectos de saturación notablemente diferentes. Esto sugiere que las afinidades anormalmente altas confieren efectos potenciados notablemente diferentes. Estos efectos no pueden imitarse con moléculas con menor afinidad con TCR Vδ1, incluso cuando se administran a concentraciones mucho mayores (por ejemplo, 100 veces). Los resultados resumidos de la Figura 35H se presentan en forma tabulada (ver la Figura 35I). Esto resalta el descubrimiento de que las moléculas con mayor afinidad a concentraciones de saturación confieren efectos diferentes y más mejorados en comparación con una molécula con menor afinidad, incluso si se la administra a concentraciones mucho mayores.

(J)(K) Impacto de la afinidad con TCR vδ1 sobre la proliferación de células Vδ1+ que residen en el tejido.

El siguiente análisis se enfoca en la inducción de la proliferación de las células Vδ1+ conferida por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 3x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 1,5x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, las células diana se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 µM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de

anticuerpos multiespecíficos de ensayo variaron de 2 nM a 0,25 pM. Las células se incubaron durante 5 o 7 días a 37 °C, 5 % de CO2. Se agregó medio completo con la adición de citocinas (IL-2, IL-15, IL-4 e IL-21; se necesitan unidades) el día 3 y el día 5. Las células se lavaron y se tiñeron para detectar células muertas (eFlour 780, Invitrogen) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences). La cantidad de eventos se midió mediante citometría de flujo al día siguiente con el MACS Quant Analyzer 10.

Conclusión: Estos estudios refuerzan adicionalmente el hallazgo de que una mayor afinidad confiere efectos más potenciados en donde se observa una correlación directa entre una mayor inducción de la proliferación de los linfocitos T Vδ1 y una mayor afinidad. Ver la Figura 35J (que se resume en forma tabulada en la Figura 35K). Esto alcanza su punto máximo de notoriedad en la versión con la mayor afinidad, que presenta las menores EC50 y EC95 y las mayores cantidades máximas de células. Las moléculas con mayor afinidad son más potentes en lo que respecta a impulsar la proliferación de los linfocitos T Vδ1. Curiosamente, y con ciertas diferencias con respecto a otros efectos técnicos conferidos por las moléculas con mayor afinidad, la variante de moléculas con menor afinidad puede conferir efectos similares cuando se la administra a concentraciones 100 veces mayores en esta instancia.

(L) Resumen general de este estudio

Ver la Figura 35L.

Este resumen resalta

(i) los efectos técnicos ventajosos conferidos por los anticuerpos de la presente invención con una mayor afinidad (menor de 10 nM) con el TCR Vδ1+; y

(ii) cuáles de los efectos reducidos conferidos por las moléculas con menor afinidad (más de 10 nM) pueden compensarse luego al aumentar la concentración 100 veces o más.

(M) Impacto de la cantidad de copias de TAA.

Los hallazgos anteriores resumidos en la Figura 35L resaltan algunos resultados intrigantes. Específicamente,

(i) las moléculas con alta afinidad (con TCR Vδ1) proporcionan efectos potenciados en comparación con las variantes de moléculas con menor afinidad y

(ii) los efectos reducidos conferidos por variantes con menor afinidad no siempre pueden compensarse al aumentar la concentración de estas moléculas.

Sin embargo, los inventores investigaron luego el impacto de la cantidad de copias frente a la segunda diana (EGFR en este caso) en tales ensayos. (Ver la Figura 35M). Los estudios emplearon las mismas metodologías descritas anteriormente, pero reemplazaron la línea de células cancerosas con menor cantidad de copias de TAA (A375) por la línea de células cancerosas (A431), que presenta una cantidad de copias extremadamente alta. Resulta intrigante

que, en este estudio equivalente que implicó por ende la coincubación de células Vδ1+ primarias con una línea de células cancerosas EGFR+ con una cantidad de copias excepcionalmente alta, se descubrió un hallazgo diferente. Específicamente, en algunos casos, los efectos inferiores observados con las variantes con menor afinidad pueden superarse al aumentar la concentración de estas variantes en el ensayo si esto se combina con una línea de células cancerosas con una mayor cantidad de copias de TAA. Si bien las moléculas con alta afinidad exhiben efectos similares a concentraciones similares independientemente de la cantidad de copias de EGFR de la línea de células cancerosas empleada en el ensayo, en el caso de moléculas con menor afinidad, una combinación del aumento de la concentración de la molécula y el uso de una línea de células cancerosas de mayor cantidad de copias dio como resultado efectos compensatorios. Al usar concentraciones mayores de las variantes con baja afinidad en tales circunstancias, la regulación ascendente de CD107a saturada y la regulación descendente de TCR saturado conferidas por las moléculas con menor afinidad pueden, por primera vez, imitar los efectos de saturación de las moléculas con mayor afinidad.

Esto sugiere que los efectos reducidos de las moléculas con menor afinidad pueden "recuperarse" si

(a) se emplean en el ensayo líneas de células diana con una cantidad muy alta de TAA y

(b) se emplean concentraciones 100 veces mayores (o más) de la molécula.

Si bien solo se puede especular acerca del mecanismo de acción que se esconde detrás de estos hallazgos, sí resalta nuevamente las ventajas de las moléculas de la presente invención con mayor afinidad con el TCR Vδ1. Por ejemplo, la eficacia de las variantes con menor afinidad se reduce significativamente si las líneas de células cancerosas diana tienen niveles normales TAA de EGFR. Esto no se puede superar con una mayor dosis. Además, en el caso para TAA de EGFR, se entiende que los tipos de cáncer con una cantidad extremadamente alta de copias de EGFR son una minoría en lo que respecta a tipos de cáncer, por ejemplo, ver los estudios recientes sobre cierto cáncer de mama (por ejemplo, Kim *et al*. 201310.1371/journal.pone.0079014) o tipos de cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, Licitra *et al*. 2011 DOI: 10.1093/annonc/mdq588) o tipos de cáncer gástrico (por ejemplo, Zhang *et al*. 2015 doi.org/10.3892/ol.2015.3875). Por lo tanto, la mayor utilidad y las sorprendentes ventajas de los anticuerpos no naturales con mayor afinidad de la presente invención en comparación con las variantes con menor afinidad están más que claras.

EJEMPLO 14: Aumento/disminución de la afinidad en el brazo de fijación a EGFR de anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR.

Se creó una serie de anticuerpos multiespecíficos en donde

(i) la afinidad con EGFR se aumentó/disminuyó mientras que

(ii) la afinidad con Vδ1 se mantuvo constante a alrededor de 0,2 nM.

El dominio de fijación a EGFR inicial (FS1-67) para esta exploración se describió anteriormente (WO2018015448). Una motivación para modificar adicionalmente este dominio de fijación fue intentar ajustar precisamente la afinidad de este dominio cuando se emplea en anticuerpos multiespecíficos de la presente invención. Al hacerlo, los inventores descubrieron que devolver ciertos aminoácidos en el dominio de fijación a EGFR a la secuencia de inmunoglobulina humana de tipo silvestre tuvo un mayor efecto sobre la afinidad con la diana de EGFR que otros. Esta exploración dio como resultado el descubrimiento de un panel de dominios de fijación ajustados con mayor precisión con un rango de opciones de afinidad de alrededor de 1 nM de fijación a alrededor de 140 nM con EGFR. Los diferentes dominios de fijación a EGFR confirieron diversas propiedades distintivas cuando se los incorporaron en anticuerpos multiespecíficos de la presente invención. En consecuencia, este panel de anticuerpos multiespecíficos también demostró ser invaluable al explorar y determinar la función de la afinidad.

También se incluyó en este estudio, en los casos indicados, el control D1.3xFS1-67 multiespecífico (que comprende un segundo dominio de fijación a EGFR con 1 nM de afinidad y el primer dominio de fijación comprendía dominio de fijación a lisozima de pollo).

(A) Resumen de afinidad

Se presentan la nomenclatura y la afinidad de este panel de moléculas multiespecíficas.

Método de SPR para el ejemplo 14: Para EGFR humano, se acopló proteína recombinante (Stratech; 10001-H08H-SIB-100ug) con un Carboxylmethyl Dextran Sensor Chip (Reichert Technologies) para obtener un aumento del nivel inicial de aproximadamente 500 uRIU. Se inyectaron rangos de concentración de anticuerpos (7,5 – 200 nM) en amortiguador PBS-T con los siguientes parámetros: 180 s de asociación, 660 s de disociación, velocidad de flujo 25 µl/min, amortiguador de corrida PBS-T. La superficie del chip se regeneró con ácido fosfórico 20 mM tras cada inyección. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. El ajuste de estado estacionario se determinó de acuerdo con una fijación de Langmuir 1:1 mediante el uso del *software* TraceDrawer (Reichert Technologies).

Conclusiones: Los resultados resumidos se presentan en la Figura 36A. Para este estudio, el módulo de fijación a FS1-67 a base de CH3 inicial contiene 5 modificaciones en el bucle AB, 3 en el bucle CD y 5 en el bucle EF. Al intentar modificar la afinidad de esta molécula mediante la variación de los grados, se realizaron algunos descubrimientos interesantes. Por ejemplo, se descubrió que devolver los 5 aminoácidos en el bucle AB a la secuencia de tipo silvestre tiene el impacto más significativo sobre la afinidad de fijación a EGFR (ADT1-4-2xLEE1 como se indica, rectángulo negro de líneas discontinuas). Desde luego, en comparación con la vuelta completa del bucle CD o la vuelta (parcial) del bucle EF a la secuencia de inmunoglobulina de tipo silvestre

(ADT1-4-2xLEE2 y ADT1-4-2xLEE3 respectivamente), los cambios en el bucle AB fueron los de mayor impacto. En efecto, en función de algunas medidas (presentadas más adelante), devolver el bucle AB a la secuencia de tipo silvestre dio como resultado una pérdida de la especificidad y la afinidad de fijación. Por lo tanto, resultó inesperado que la afinidad no se viese afectada cuando un aminoácido no conservador encontrado en el bucle AB de FS1-67 se modificó de vuelta de treonina (polar) a leucina (no polar). Esto se resalta al comparar la molécula ADT1-4-2 LEE (resaltada por el rectángulo negro de línea sólida, 1 cambio, impacto insignificante sobre la afinidad/función) con la molécula ADT1-4-2 LEE1 (resaltada por el rectángulo negro discontinuo, 5 cambios, impacto más grande sobre la afinidad/función). Habiendo dicho esto, la ADT1-4-2xLEE resultante que comprende ahora solo 4 cambios en el bucle AB también incorporó modificaciones adicionales. Por lo tanto, no puede descartarse que estos otros cambios (conservadores) en el bucle de fijación (D3659E, D360E) también hayan contribuido a la retención de la alta afinidad, por más de que sea sorprendente. De cualquier manera, como devolver tales modificaciones al tipo silvestre puede proporcionar un riesgo de inmunogenicidad reducida en los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención resultantes, se considera de mayor preferencia una leucina de tipo silvestre en la posición 358, y como parte de un cambio de 4 aminoácidos en el bucle AB, que 5 (o más) cambios de aminoácidos como se encuentran en los dominios de fijación a EGFR FS1-67, FS1-65 o 747 iniciales incorporados en ADT1-4-2xFS1-67, ADT1-4-2xFS1-65 y ADT1-4-2x747 respectivamente.

(B)(C) Impacto de la afinidad con EGFR sobre la fijación multiespecífica a la línea celular de cáncer de colon EGFR+ HT-29.

Método: La fijación de ejemplo de los anticuerpos multiespecíficos EGFRxVδ1 se determinó al incubar células diana HT-29 EGFR+ con anticuerpos que se diluyeron en serie en PBS hasta un rango de concentraciones de 500 nM a 0,13 pM durante 20 minutos a 4 grados. Después de lavarlas, las células se incubaron durante 20 minutos adicionales con anticuerpos secundarios anti-IgG humana (Jackson Immunoresearch) y tinción para detectar células vivas/muertas (eFluor 780, Invitrogen) antes de su lavado y fijación con CellFix. La cantidad de anticuerpo fijada a cada tipo celular se determinó mediante citometría de flujo (MACSQuant Analyser 10, Miltenyi Biotech).

Conclusiones: Los datos presentados sugieren que se observó una correlación fuerte, directa y graduada entre una mayor afinidad con EGFR y un mayor nivel de fijación de anticuerpo multiespecífico a células cancerosas HT-29 EGFR+. Ver la Figura 36B. La Figura 36C presenta los resultados de la Figura 36B en forma tabulada.

Luego se estudiaron efectos adicionales de estas moléculas en la siguiente serie de experimentos. Sucintamente, se coincubaron células efectoras Vδ1+ derivadas de tejido cutáneo

con una línea de células cancerosas de melanoma A375 EGFR+ de la siguiente manera: se sembraron células diana EGFR+ en placas para cultivo de tejidos de cavidades múltiples ~16 horas antes de preparar el ensayo. Al día siguiente, los anticuerpos se diluyeron en serie hasta un rango de concentraciones en crecimiento basal antes de agregarlos a células diana EGFR+. Se separaron linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel de matraces de cultivo y se sembraron suspensiones celulares en placas de ensayo, y los cocultivos se incubaron durante la duración especificada a 37 °C, 5 % de CO2. Las células se procesaron y analizaron en función de la lectura seleccionada, como se describe en cada caso. Los resultados de estos estudios se presentan de la siguiente manera:

(D)(E) Impacto de la afinidad con EGFR sobre la regulación descendente de TCR Vδ1 de células Vδ1+ que residen en el tejido.

El siguiente análisis se enfoca en la inducción de la internalización de TCR Vδ1 tras el acoplamiento con el anticuerpo multiespecífico.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 2,5x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 2,5x10^4 células diana EGFR+ A375 por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, los linfocitos T γδ Vδ1 se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 µM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de anticuerpos de ensayo variaron de 10 nM a 0,13 pM. Tras incubarlas durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO2, las células se recolectaron y se tiñeron para detectar las células muertas (eFlour 780, Invitrogen) y la expresión superficial de TCR Vδ1 (MiltenyiBiotec) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de analizarlas en un citómetro de flujo MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi).

Conclusiones: La reducción de MFI de TCR Vδ1 es un indicio de una mayor regulación descendente de TCR y, específicamente, se descubrió que, a mayor afinidad con EGFR, mayor la reducción de esta señal. Notablemente, no obstante, la relación entre la afinidad con EGFR y la inducción de la regulación descendente de TCR no pareció ser una correlación graduada, sino una dependiente de un valor de afinidad umbral. Específicamente, tres moléculas (ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE2 y ADT1-4-2xLEE3) que exhibieron respectivamente una afinidad de alrededor de 1 nM, alrededor de 9 nM y alrededor de 19 nM con EGFR se agruparon a poca distancia entre sí y confirieron efectos similares de regulación descendente de TCR y valores asociados de EC50. Estas tres moléculas mostraron una diferencia significativa en comparación con ADT1-4-2xLEE1. Como se analizó anteriormente, esta molécula contiene un bucle AB de inmunoglobulina de tipo silvestre y exhibe la afinidad más baja de alrededor de 140 nM. Esta molécula no confiere los efectos de regulación descendente de TCR deseados en comparación con las otras tres moléculas incluso cuando se la combina con el dominio de fijación ADT1-4-2 anti-TCR Vδ1 con alta afinidad

como es el caso aquí. Esto sugeriría que existe un efecto umbral o un efecto de gradiente pronunciada con anticuerpos multiespecíficos tales como ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE2 y ADT1-4-2xLEE3 agrupados entre sí y separados de moléculas con menor afinidad con EGFR tales como ADT1-4-2xLEE1. Esto se diferencia de los eventos más superficiales y graduados de afinidad/fijación vistos anteriormente (ver la Figura 36B anterior), en donde los efectos de fijación conferidos por estos anticuerpos multiespecíficos se clasificaron en función de sus afinidades respectivas con la segunda diana de fijación a EGFR en lugar de agruparlos más en dos grupos diferenciados. Ver la Figura 36D. La Figura 36E presenta los resultados de la Figura 36D en forma tabulada.

(F)(G) Impacto de la afinidad con EGFR sobre la desgranulación de células Vδ1+ que residen en el tejido

El siguiente análisis se enfoca en los efectos de desgranulación conferidos por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 2,5x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 2,5x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, los linfocitos T γδ Vδ1 se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 µM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de anticuerpos multiespecíficos de ensayo variaron de 10 nM a 0,13pM. Además, se agregó un anticuerpo conjugado con fluoróforo específico para CD107a (MiltenyiBiotec) al comienzo de la coincubación. Tras incubarlas durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO2, las células se recolectaron y se tiñeron para detectar las células muertas (eFlour 780, Invitrogen) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de analizarlas en un citómetro de flujo MACSQuant 16 (Miltenyi).

Conclusiones: Estos estudios demuestran nuevamente que una mayor afinidad con EGFR confiere efectos óptimos en donde se observa una correlación directa entre una mayor regulación ascendente de CD107a y una mayor afinidad. Esta relación depende de un valor de afinidad umbral. Como con la regulación descendente de TCR, los anticuerpos multiespecíficos con un rango de afinidad con EGFR de alrededor de 1 a alrededor de 19 nM se agruparon funcionalmente entre sí e indujeron niveles significativamente mayores de CD107a en comparación con la molécula con menor afinidad (ADT1-4-2xLEE1). Estos datos sugieren que los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención con afinidades de alta a media con EGFR impulsan efectos notablemente diferentes y más favorables en ciertos escenarios que no pueden repetirse con moléculas con menor afinidad con EGFR, incluso cuando se las administra a concentraciones mucho mayores (por ejemplo, 1000 veces). Los resultados se muestran en la Figura 36F, y se resumen en forma tabulada en la Figura 36G.

(H)(I) Impacto de la afinidad con EGFR sobre el estado de activación de 41BB de células Vδ1+ que residen en el tejido.

El siguiente análisis se enfoca en el aumento del marcador inducido por la activación 41BB de las células Vδ1+ conferido por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 2x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 2x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, los linfocitos T γδ Vδ1+ se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 μM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de anticuerpos multiespecíficos de ensayo variaron de 10 pM a 0,13 pM. Tras incubarlas durante 24 horas a 37 °C, 5 % de CO2, las células se recolectaron y se tiñeron para detectar las células muertas (eFlour 780, Invitrogen) y la expresión superficial de 41BB (MiltenyiBiotec) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de analizarlas en un citómetro de flujo MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi).

Conclusiones: Los datos presentados aquí (ver la Figura 36H y un resumen tabulado en la Figura 36I) demuestran que los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención con mayores afinidades con EGFR son los más eficaces en lo que respecta a estimular una mayor activación de 41BB de las células Vδ1+. Como con algunos otros estudios analizados anteriormente, se observaron nuevamente diferencias cualitativas significativas entre el anticuerpo multiespecífico con la menor afinidad con EGFR de alrededor de 140 nM y los anticuerpos multiespecíficos con una afinidad de media a alta con EGFR (los que están por debajo del umbral de 20 nM), en donde la menor afinidad fue incapaz de inducir una marcada activación de células Vδ1+. Esto sugiere un umbral en el que las afinidades de medias a altas están funcionalmente agrupadas entre sí, como se mide mediante la regulación ascendente de 41BB en esta ocasión. Nuevamente, estos efectos no pueden repetirse con moléculas con menor afinidad con EGFR, incluso cuando se administran a concentraciones mucho mayores (por ejemplo, 1000 veces). Curiosamente, no obstante, también se observó que los mayores niveles de 41BB con saturación para la molécula con la mayor afinidad (ADT1-4-2xLEE, alrededor de 1 nM) fueron menores que los observados para las moléculas multiespecíficas de rango medio de la presente invención, a entre alrededor de 9 nM-19 nM (ADT1-4-2xLEE2 y ADT1-4-2 LEE3). Esta observación, que la afinidad más alta puede no siempre ser la más preferida, se analiza adicionalmente más adelante en la presente.

(J)(K) Impacto de la afinidad con EGFR sobre la función citolítica multiespecífica hacia células cancerosas EGFR+.

El siguiente análisis se enfoca en el efecto citolítico conferido por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de

4x10^3 linfocitos T γδ Vδ1 a 4x10^3 células diana EGFR+ por cavidad en placas CellCarrier Ultra de 384 cavidades (PerkinElmer). Las concentraciones finales de anticuerpos de ensayo variaron de 5 nM a 0,03 pM. Tras incubarlas durante 24 horas a 37 °C, 5 % de CO2, las células se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen) y para detectar las células muertas (DRAQ7, Abcam) durante 1 hora a 37 °C. Se obtuvieron imágenes de las células en un sistema Opera Phenix (PerkinElmer) y se determinó la cantidad de células diana viables con un modelo de regresión lineal (Harmony 4.9) en función del tamaño, morfología, textura e intensidad de las tinciones de células vivas y la ausencia de tinción de DRAQ7.

Conclusiones: Estos datos demuestran que las moléculas con mayor afinidad con EGFR son las más potentes y citolíticas hacia las células cancerosas EGFR+. Nuevamente, se observaron diferencias cualitativas significativas entre el anticuerpo multiespecífico con la menor afinidad con EGFR (a alrededor de 140 nM) y los anticuerpos multiespecíficos con una afinidad de media a alta con EGFR (a alrededor de 1 nM a 19 nM). En efecto, la molécula con baja afinidad con EGFR (ADT1-4-2xLEE1) no indujo una inactivación medible de la diana. Por lo tanto, este es otro ejemplo en donde se observa un efecto umbral por el cual las moléculas de alrededor de 1 nM a alrededor de 19 nM (ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2xLEE2) confieren un efecto funcional más óptimo agrupado. Estos efectos no pueden repetirse con moléculas con menor afinidad con EGFR, incluso cuando se administran a concentraciones mucho mayores (por ejemplo, 10.000 veces). Los resultados se muestran en la Figura 36J, y se resumen en forma tabulada en la Figura 36K.

(L)(M) Impacto de la afinidad con EGFR sobre la proliferación de células Vδ1+ que residen en el tejido;

El siguiente análisis se enfoca en la inducción de la proliferación de las células Vδ1+ conferida por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 3x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 1,5x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, las células diana se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 µM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de anticuerpos multiespecíficos de ensayo variaron de 2 nM a 0,25 pM. Las células se incubaron durante 5 o 7 días a 37 °C, 5 % de CO2. Se agregó medio completo con la adición de citocinas (IL-2, IL-15, IL-4 e IL-21; se necesitan unidades) el día 3 y el día 5. Las células se lavaron y se tiñeron para detectar células muertas (eFlour 780, Invitrogen) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences). La cantidad de eventos se midió mediante citometría de flujo al día siguiente con el MACS Quant Analyzer 10.

Conclusiones: Estos estudios demuestran nuevamente que una mayor afinidad confiere

efectos más óptimos en donde se observa una correlación directa entre una mayor inducción de la proliferación de los linfocitos T Vδ1 y una mayor afinidad. Nuevamente, se observa un efecto de agrupamiento en donde los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención con afinidades de medias a altas con EGFR en el rango de alrededor de 1 nM a alrededor de 19 nM (ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE3, ADT1-4-2LEE2) se agrupan funcionalmente, mientras que la molécula con menor afinidad, de alrededor de 140 nM (ADT1-4-2xLEE1), se ve afectada de manera significativa y es equivalente al control sin fijación (a TCR) en este ensayo. Curiosamente, y de manera similar al efecto de 41BB (ver la Figura 36H), la afinidad más alta a alrededor de 1 nM de afinidad con EGFR no confiere los efectos de saturación más altos. En cambio, las moléculas con afinidad de rango medio a alrededor de 9 nM-19 nM (ADT1-4-2xLEE3 y ADT1-4-2xLEE2 respectivamente) confieren los mayores efectos proliferativos a concentraciones de saturación de los anticuerpos. Este efecto más óptimo otorgado por los anticuerpos multiespecíficos con afinidad de rango medio de la presente invención se analiza más adelante en la presente. Los resultados se muestran en la Figura 36L, y se resumen en forma tabulada en la Figura 36M.

(N) Afinidad con EGFR e impacto de la cantidad de copias de TAA de las células cancerosas

Estos estudios resaltan el efecto de la afinidad con EGFR en el caso de los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Luego, estos efectos se compararon con los efectos observados cuando se emplea la línea celular A431 con una cantidad extremadamente alta de copias en lugar de la línea celular A375 con menor cantidad de copias en estudios de coincubación de células Vδ1+/células cancerosas EGFR+.

Se presenta un resumen de esta comparación en la Figura 36N y se descubrió que, en el caso de tipos de cáncer con una cantidad extremadamente alta de copias de EGFR representados por A431, algunos de los efectos reducidos observados por el anticuerpo multiespecífico con menor afinidad de alrededor de 140 nM (ADT1-4-2xLEE1) podrían "recuperarse". Sin embargo, esta recuperación aún era graduada, y la molécula con menor afinidad aún no se "agrupó" con las variantes con afinidad de media a alta de ADT1-4-2xLEE, ADT1-4-2xLEE2 y ADT1-4-2xLEE3. Sin embargo, esta observación es de interés y sugiere que las variantes con menor afinidad son más funcionales (y por ende más selectivas) para células cancerosas que tienen una mayor cantidad de copias de EGFR.

De manera adecuada, las propiedades funcionales de los anticuerpos cuando se proporcionan en un formato monoespecífico se comparten por los anticuerpos multiespecíficos de la invención que se fijan además específicamente a un segundo antígeno.

EJEMPLO 15: Impacto de la afinidad sobre la fijación preferencial a células Vδ1 en

comparación con las células EGFR.

El siguiente experimento investiga cómo aumentar y disminuir la afinidad en los dominios de fijación respectivos afectan la distribución molecular y la fijación preferencial. Específicamente, este estudio investigó cómo la variación de la afinidad de fijación a las dianas Vδ1 y EGFR respectivas afecta luego las preferencias de fijación para los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos con la adición de 2x10^4 linfocitos T Vδ1 a 2x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Se agregó luego una cantidad "limitativa" (16 pM) de cada anticuerpo multiespecífico como se indica y las células se incubaron durante 20 min a 4 °C. Las células se incubaron durante 20 minutos adicionales con anticuerpos secundarios anti-IgG humana (Jackson Immunoresearch) y tinción para detectar células vivas/muertas (eFluor 780, Invitrogen) antes de lavarlas y fijarlas (BD Cell fix). La cantidad de anticuerpo fijada a cada tipo celular se determinó mediante citometría de flujo (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotech).

Conclusiones: La Figura 37(A) muestra el impacto de la afinidad sobre la fijación preferencial a Vδ1 en comparación con las células EGFR con un formato de gráfico de barras: La distribución relativa entre los dos tipos celulares se muestra para cada anticuerpo como se indica. Estos datos demuestran que la modificación de la afinidad con Vδ1 tiene solo un efecto marginal sobre las relaciones de fijación y los perfiles de distribución. Por el contrario, parece que hay un efecto más profundo cuando se modifica la afinidad con el dominio de fijación a EGFR. Específicamente, los anticuerpos multiespecíficos con menores afinidades con EGFR exhiben una preferencia considerable hacia la fijación a Vδ1, en donde el menor aglutinante de EGFR ADT1-4-2xLEE1 (Kd, 140 nM) demuestra la mayor preferencia por las células Vδ1. En resumen, estos resultados demuestran que, al aumentar y disminuir la afinidad de los dominios de fijación respectivo, se pueden seleccionar y dirigir potencialmente diferentes perfiles de distribución en diana celular/tejido. Además, cuando estos hallazgos se combinan con otros en la presente, esto sugiere que, si bien los anticuerpos con afinidad media con EGFR de la presente invención (de entre alrededor de 9 nM y alrededor de 19 nM) exhiben efectos similares en diversos sentidos a las variantes con mayor afinidad (de alrededor de 1 nM de afinidad con EGFR), tales anticuerpos multiespecíficos con afinidad media de la presente invención sí varían en otros sentidos y pueden ofrecer una depuración de anticuerpos mediada por tumor, distribución y perfil de bloqueo de EGF más favorables en ciertas circunstancias. A su vez, esto puede ofrecer un mayor potencial para reducir adicionalmente las toxicidades cutáneas limitativas de la dosis en comparación con variantes con mayor afinidad con EGFR de la presente invención. La Figura 37B presenta los resultados de la Figura (A) en formato tabulado y la Figura 37C presenta los resultados de la (A/B)

como una relación.

EJEMPLO 16: Afinidad con EGFR; impacto sobre la internalización del anticuerpo multiespecífico por parte de las células tumorales A431

(A)(B) Este análisis se enfoca en la internalización de ciertos anticuerpos multiespecíficos (y comparadores). Como se describió anteriormente, se creó una serie de anticuerpos multiespecíficos en donde

(i) la afinidad con EGFR se aumentó/disminuyó con un rango de opciones de afinidad de alrededor de 1 nM de fijación a alrededor de 140 nM con EGFR mientras que

(ii) (ii) la afinidad con Vδ1 se mantuvo constante a alrededor de 0,2 nM.

También se incluyó en este estudio, en los casos indicados, el comparador de IgG RSV monoespecífico (que comprende dominios de fijación a la proteína RSV), el control D1.3xFS1-67 multiespecífico (que comprende un segundo dominio de fijación a EGFR con 1 nM de afinidad y el primer dominio de fijación comprendía dominio de fijación a lisozima de pollo).

Métodos: Se establecieron cultivos con 4x10^3 células tumorales A431 EGFR+ por cavidad en placas CellCarrier Ultra de 384 cavidades (PerkinElmer). Los anticuerpos se etiquetaron covalentemente con fluoróforos Cy5 mediante el uso de un kit de conjugación de anticuerpos Lightning Link (Abcam), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de la adición de anticuerpo, se obtuvieron imágenes de las células en un sistema Opera Phenix (PerkinElmer) con el conjunto de filtros Cy5. Luego se agregaron anticuerpos etiquetados a concentraciones finales de 1 nM y se obtuvieron imágenes de las células en Opera Phenix durante 8,5 horas adicionales a intervalos de 15 minutos. La intensidad de Cy5 dentro de las regiones intracelulares se determinó mediante análisis con Harmony 4.9.

Conclusiones: Estos datos demuestran que las moléculas multiespecíficas con menor afinidad con EGFR presentan la internalización menos mediada por EGFR en células tumorales A431 diana. Se observaron diferencias significativas entre el anticuerpo multiespecífico con la menor afinidad con EGFR (a alrededor de 140 nM; equivalente a control sin anticuerpo) y los anticuerpos multiespecíficos con afinidad alta con EGFR (a alrededor de 1 nM). Específicamente, se descubrió una correlación positiva entre la afinidad con la diana EGFR y el nivel observado de internalización de anticuerpo. Esto representa un ejemplo de un efecto graduado asociado con la afinidad con EGFR de moléculas de la presente invención de alrededor de 1 nM a alrededor de 140 nM. Los resultados se muestran en la Figura 38A y se tabulan en la Figura 38B.

(C)(D) Este análisis se enfoca en la depuración de los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente invención. Depuración en este caso se refiere a la eliminación del anticuerpo del medio de cultivo de cultivos de células A431 mediante la internalización de anticuerpos mediada por EGFR.

Métodos: Se establecieron cultivos con 2x10^4 células tumorales A431 EGFR+ por cavidad en placas tratadas con TC de 96 cavidades y fondo plano. Las concentraciones finales de anticuerpos de ensayo variaron de 5 nM a 1,6 pM. Tras una incubación de 24 horas a 37 °C, 5 % de CO2, se recolectaron los sobrenadantes y se los almacenó para un análisis adicional. Las concentraciones de anticuerpo multiespecífico se determinaron mediante ELISA interno. Sucintamente, se realizaron ELISA con 1 ug de antígeno Vδ1 colocado directamente a modo de recubrimiento en la placa, seguido de bloqueo con amortiguador de bloqueo. Los sobrenadantes recolectados se agregaron a la placa y se lavaron y se usó anti-Fc humano-HRP como anticuerpo secundario a una dilución de 1/2000. El desarrollo fue con 50 µl de solución de TMB, y la absorbancia se midió a 450 nM con un lector de microplacas (Tecan).

Conclusiones: Estos datos demuestran que las moléculas multiespecíficas con menor afinidad con EGFR presentan la depuración menos mediada por EGFR del anticuerpo. Se observaron diferencias significativas entre el anticuerpo multiespecífico con la menor afinidad con EGFR (a alrededor de 140 nM; equivalente a control sin anticuerpo) y los anticuerpos multiespecíficos con afinidad alta con EGFR (a alrededor de 1 nM). Además, esto demuestra una correlación positiva entre la afinidad con la diana EGFR y el nivel observado de depuración de anticuerpo. Nuevamente, estos hallazgos resaltan la correlación directa y graduada entre la afinidad del anticuerpo multiespecífico con EGFR y la internalización mediada por EGFR para moléculas con una afinidad de alrededor de 1 nM a alrededor de 140 nM con la diana EGFR. Los resultados se muestran en la Figura 38C y se tabulan en la Figura 38D.

EJEMPLO 17: Impacto de la afinidad con EGFR sobre la inhibición generada por el anticuerpo multiespecífico de la fijación al ligando de EGF y la proliferación de células tumorales.

(A)(B) Este análisis se enfoca en la inhibición (o bloqueo) de la fijación de EGF a células tumorales EGFR positivas por parte de los anticuerpos multiespecíficos (y comparadores) descritos en la presente invención. También se incluyó en este estudio, en los casos indicados, el comparador de IgG RSV monoespecífico (que comprende dominios de fijación a la proteína RSV).

Métodos: El bloqueo de EGF mediado por los anticuerpos multiespecíficos EGFRxVδ1 se determinó al incubar 3x10^4 células diana A431 EGFR+ con anticuerpos que se diluyeron en serie en PBS hasta un rango de concentraciones de 250 nM a 3,2 pM durante 30 minutos a 4 grados. Las células se lavaron y se agregó una concentración final de 40 ug/ml de EGF (EGF-AF647, Life Tech) por cavidad. Las células luego se incubaron durante 1 hora a 4 grados C, se lavaron, se tiñeron con tinte para células vivas/muertas (eFluor 520, Fisher) y se incubaron durante 20 min adicionales a 4 grados. Las células se lavaron en amortiguador de FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de incubar durante la noche a 4 °C en la oscuridad. El

bloqueo de EGF se midió mediante citometría de flujo al día siguiente con el MACS Quant Analyzer 10.

Conclusiones: La reducción de MFI mostrada en las Figuras 39A y 39B es un indicio de un mayor bloqueo de la fijación de EGF a células A431 EGFR positivas. Para los anticuerpos multiespecíficos descritos, hay una correlación directa entre la afinidad con la diana EGFR y el nivel observado de bloqueo de EGF. Esto representa un ejemplo adicional de efectos graduados conferidos por moléculas con afinidades con EGFR de alrededor de 1 nM a alrededor de 140 nM.

(C)(D) El siguiente análisis se enfoca en la inhibición de la proliferación de células tumorales conferida por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Sucintamente, se sembraron células A431 EGFR+ en placas para imágenes de 384 cavidades (Perkin Elmer) para obtener una densidad de siembra final de 2x10^3 células diana por cavidad antes de incubar durante la noche a 37 °C, 5 % de CO2. Los anticuerpos se diluyeron en medio de crecimiento basal y se diluyeron en serie 1:5 antes de agregarlos a las placas de ensayo para obtener concentraciones finales de ensayo de 500 nM a 0,05 pM. Las células se cultivaron durante 24 horas antes de teñirlas con Hoechst (1:1000 final, Invitrogen) y DRAQ7 (1:300 final, Abcam). Para determinar las cantidades de células diana vivas, se adquirieron imágenes confocales con una plataforma de alto contenido Opera Phenix al capturar nueve campos de visión con un aumento de 10x. Los recuentos de células vivas se cuantificaron en función del tamaño, morfología, textura e intensidad de las tinciones de células vivas y la ausencia de tinción de DRAQ7.

Conclusiones: Los datos presentados en las Figuras 39C y 39D demuestran que los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención con mayores afinidades con EGFR son los más eficaces en lo que respecta a inhibir la proliferación de las células tumorales EGFR positivas. Nuevamente, esto demuestra una clara correlación positiva entre la afinidad con la diana EGFR y el nivel observado de inhibición de la proliferación tumoral. Por lo tanto, este es otro ejemplo que resalta la correlación entre los efectos graduados y la afinidad con la diana EGFR (de alrededor de 1 nM a alrededor de 140 nM).

EJEMPLO 18: Preservación de células EGFR+ sanas - anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR

Métodos: El efecto de los anticuerpos biespecíficos EGFR-Vδ1 sobre la citotoxicidad de células diana EGFR+ se determinó con imágenes confocales de alto contenido en el Opera Phenix (Perkin Elmer). Sucintamente, se sembraron células A375 EGFR+ (melanoma) y HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana) en placas para imágenes de 384 cavidades (Perkin Elmer) para obtener una densidad de siembra final de 5000 células diana por cavidad antes de incubar durante la noche a 37 °C, 5 % de CO2. Los anticuerpos se diluyeron en medio de

crecimiento basal y se diluyeron en serie 1:5 antes de agregarlos a las placas de ensayo para obtener concentraciones finales de ensayo de 1 nM a 0,0005 pM. Se separaron linfocitos T γδ Vδ1 derivados de la piel expandidos de matraces de cultivo de tejidos y se volvieron a suspender en medio de crecimiento basal antes de agregarlos a la placa de ensayo de 5000 células por cavidad a una relación efector:diana de 1:1. Las células se cocultivaron durante 24 horas antes de teñirlas con Hoechst 33342 (1:1000 final, Invitrogen) y DRAQ7 (1:300 final, Abcam). Para determinar las cantidades de células diana vivas, se adquirieron imágenes confocales con una plataforma de alto contenido Opera Phenix al capturar nueve campos de visión con un aumento de 10x. Los recuentos de células vivas se cuantificaron en función del tamaño, morfología, textura e intensidad de las tinciones de células vivas y la ausencia de tinción de DRAQ7. Los resultados se muestran en la Figura 40 A-C.

En la Figura 40A se presentan los efectos de titulación de la dosis. Estos datos ayudan a resaltar la capacidad innata de los linfocitos T Vδ1 para diferenciar entre células sanas y malignas. Un anticuerpo multiespecífico de la presente invención redirige los linfocitos T Vδ1 para que inactiven las células tumorales EGFR+ mientras "preservan" las células sanas que expresan cantidades comparables de copias de EGFR. En la Figura 40C se presentan los resultados tabulados de (A).

En la Figura 40B se presentan imágenes de microscopía representativas del experimento descrito en (A) que demuestran la citotoxicidad inducida por linfocitos T de las células tumorales A375, junto con la "preservación" de las células HUVEC sanas. Las imágenes se muestran en escala de grises, y los núcleos celulares están teñidos con Hoechst 33342.

EJEMPLO 19: Anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR: Comparación de respuesta a la dosis de ADT1-4-2xFS1-67 con ADT1-4xFS1-67 "parental" con menor afinidad (alias G04 FS1-67).

Los inventores demostraron anteriormente que el anticuerpo multiespecífico G04 FS1-67 "parental" (sin maduración de afinidad) confiere diversos efectos técnicos deseados en cocultivos que comprenden células Vδ1+ y células A431 diana (WO2021032963).

Específicamente, los inventores observaron que este anticuerpo multiespecífico puede potenciar la citotoxicidad hacia las células A431 en más de 200 %. En esta serie de experimentos, G04 FS1-67 (SEQ ID NO: 379), que comprende un primero dominio de fijación a Vδ1 "parental" con menor afinidad (de alrededor de 126 nM) y una fijación a EGFR con alta afinidad (de alrededor de 1 nM), se comparó con un anticuerpo multiespecífico equivalente pero que contenía un primer dominio de fijación a Vδ1 de variante con maduración de afinidad ADT1-4-2 (afinidad de alrededor de 0,2 nM) (SEQ ID NO: 414).

Método: En este análisis, se coincuban células efectoras Vδ1+ con células cancerosas

EGFR+ de la manera indicada, con la inducción de la internalización de TCR Vδ1 tras medir el acoplamiento del anticuerpo multiespecífico. Se establecieron cocultivos con la adición de 2,5x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 2,5x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, los linfocitos T γδ Vδ1 se tiñeron con el tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 µM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de anticuerpos de ensayo variaron de 10 nM a 0,13 pM. Tras incubarlas durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO2, las células se recolectaron y se tiñeron para detectar las células muertas (eFlour 780, Invitrogen) y la expresión superficial de TCR Vδ1 (MiltenyiBiotec) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de analizarlas en un citómetro de flujo MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi).

Conclusiones: Los resultados de esta comparación se presentan ahora en la Figura 41A (y en forma tabulada en la Figura 41B) y coinciden con los descubrimientos descritos en otra parte de la presente. Se presenta la reducción en MFI (y por ende de la regulación descendente de TCR) y este estudio comparativo confirma adicionalmente que (i) el anticuerpo multiespecífico con afinidad anormalmente alta con Vδ1 de la presente invención confiere efectos potenciados en comparación con las variantes con menor afinidad (G04 FS1-67 en este caso) y que (ii) estos efectos potenciados son específicamente detectables en estudios con células cancerosas diana con una menor cantidad de copias de TAA tales como A375. Estos datos también resaltan que, nuevamente, para las moléculas con menor afinidad con vd1 (comparador G04 FS1-67 en este caso), no se pueden lograr efectos de regulación descendente de TCR equivalentes en cocultivos de Vδ1/A375 incluso con la adición de 100 veces más de esta molécula.

EJEMPLO 20: Anticuerpos multiespecíficos VD1xEGFR: Comparación con un anticuerpo multiespecífico CD3xEGFR

Se creó un anticuerpo multiespecífico comparativo en donde

(i) la afinidad con EGFR se mantuvo constante a alrededor de 0,2 nM y

(ii) el dominio variable dirigido a Vδ1 se sustituyó por un dominio variable específico para CD3ε (derivado de OKT3).

Esta molécula (denominada CD3/ADT3-2) luego se comparó con el multiespecífico Vδ1xEGFR ADT1-4-2/ADT3-2 (alias ADT1-4-2xLEE) descrito anteriormente en otra parte de la presente. Una motivación para esta comparación fue comparar las diferencias en la activación de linfocitos T conferida por TCE (acopladores de linfocitos T) multiespecíficos dirigidos al TCR Vδ1 en comparación con los que se acoplan a través del correceptor de CD3ε. Al hacerlo, los inventores descubrieron que los TCE multiespecíficos que se acoplan a los linfocitos T a través del TCR Vδ1 confieren efectos distintivos en comparación con los TCE multiespecíficos que se acoplan a los linfocitos T a través de CD3ε. Estos efectos se presentan en el siguiente conjunto de

experimentos. También se incluyó en estos estudios el control D1.3xFS1-67 multiespecífico (que comprende un segundo dominio de fijación a EGFR con 1 nM de afinidad y el primer dominio de fijación comprendía dominio de fijación a lisozima de pollo).

(A)(B) Diferenciación con anticuerpo multiespecífico CD3xEGFR; Impacto del receptor diana de linfocitos T sobre la regulación descendente de CD3ε y TCR Vδ1. El siguiente experimento determina cómo el direccionamiento a diferentes receptores de linfocitos T (Vδ1 o CD3ε) afecta la inducción de la internalización de TCR Vδ1 tras el acoplamiento con el anticuerpo multiespecífico.

Método: Se evaluó un rango de poblaciones de linfocitos T de la manera indicada en la leyenda mostrada en la Figura 42A. Estas incluyeron PBMC y linfocitos T γδ Vδ1 purificados aislados de tejido cutáneo o directamente de sangre periférica. Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 2x10^4 linfocitos T a 2x10^4 células tumorales A375 EGFR+ A375 por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Luego se agregaron anticuerpos a concentraciones finales de 1 nM y se incubaron cultivos durante 4 a 37 °C, 5 % de CO2. Las células se recolectaron y se tiñeron para detectar las células muertas (eFlour 780, Invitrogen), TCR Vδ1 (Miltenyi) y la expresión superficial de CD3ε (Miltenyi) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences) antes de analizarlas en un citómetro de flujo MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi).

Conclusiones: La reducción en MFI se presenta en la Figura 42A. Notablemente, se observó una regulación descendente de TCR más potente mediante el acoplamiento del anticuerpo del complejo de TCR a través de Vδ1 que a través de CD3ε, como se demostró con poblaciones de linfocitos T Vδ1 purificadas tanto a partir de piel como a partir de sangre periférica. Por el contrario, el acoplamiento a los linfocitos T a través de CD3ε indujo una regulación descendente de CD3 más potente en PBMC que contenían solo una población minoritaria de células Vδ1 (0,08 % en esta donación). El marcado efecto de los TCE a base de CD3 en PBMC resalta el enfoque bruto (*sledgehammer*) de esta estrategia convencional. Específicamente, los TCE a base de CD3 afectarán todas las células CD3+ presentes en PBMC, incluso Treg y linfocitos T CD4+ y CD8+. Por el contrario, los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención que se acoplan a linfocitos T a través de un primer dominio de fijación a Vδ1 son seleccionables solo para el subconjunto altamente deseable de células CD3 Vδ1+ que es por lo general más prevalente en tejidos que en sangre.

(B) Impacto del receptor diana de linfocitos T sobre la regulación descendente de TCR Vδ1. En la Figura 42B se presentan resultados tabulados de (A), que resaltan la inducción superior de la regulación descendente de TCR mediante el direccionamiento directo a TCR

Vδ1 con un multiespecífico en comparación con el direccionamiento a este complejo a través del correceptor CD3ε.

(C) Impacto del receptor diana de linfocitos T sobre la regulación descendente de CD3ε. En la Figura 42C se presentan resultados tabulados de (A), que resaltan el impacto más pronunciado del TCE a base de CD3 sobre los niveles de CD3, particularmente en PBMC no fraccionadas.

(D)(E) Impacto sobre la función citolítica multiespecífica hacia células cancerosas EGFR+. El siguiente experimento determina cómo el acoplamiento con diferentes receptores de linfocitos T (Vδ1 o CD3ε) afecta la estimulación de poblaciones de linfocitos T para lisar células diana tumorales.

Método: Como antes, se evaluó un rango de poblaciones de linfocitos T, incluso PBMC, o linfocitos T γδ purificados aislados de tejido cutáneo o directamente de sangre periférica. Se establecieron cultivos al sembrar 4x10^3 células tumorales A375 EGFR+ A375 por cavidad en placas CellCarrier Ultra de 384 cavidades (PerkinElmer). Se agregaron cantidades variables de linfocitos T para variar las relaciones de efector-diana entre 10 y 0,08. Luego se agregaron anticuerpos a concentraciones finales de 1 nM y se incubaron cultivos durante 24 a 37 °C, 5 % de CO2. Las células se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen) y para detectar células muertas (DRAQ7, Abcam) durante 1 hora a 37 °C y se tomaron imágenes de estas en un sistema Opera Phenix (PerkinElmer). La cantidad de células tumorales viables se determinó con un modelo de regresión lineal (Harmony 4.9) en función del tamaño, morfología, textura e intensidad de las tinciones de células vivas y la ausencia de tinción de DRAQ7.

Conclusiones: Los datos presentados en la Figura 42D demuestran la capacidad única del anticuerpo multiespecífico dirigido a Vδ1 para redirigir específica y solamente la población de linfocitos T Vδ1 para inactivar las células tumorales EGFR+. Esto se diferencia de los TCE a base de CD3 que funcionan de manera más promiscua como lo demuestra la observación presentada aquí de que tales TCE también redirigen las PBMC no fraccionadas hacia las células EGFR+. Los resultados tabulados de (D) se presentan en la Figura 42E. Esto resalta adicionalmente la especificidad superior de TCE a base de Vδ1 en comparación con TCE a base de CD3.

(F) Impacto sobre la secreción inducida de citocinas por linfocitos T activados. El siguiente experimento determina cómo el direccionamiento a diferentes receptores de linfocitos T (Vδ1 o CD3ε) o poblaciones diana afecta el perfil de secreción de citocinas de los linfocitos T activados.

Método: Se evaluó un rango de poblaciones de linfocitos T, incluso PBMC, o linfocitos T γδ purificados directamente de la sangre periférica de dos donantes sanos. Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 2x10^4 linfocitos T a 2x10^4 células

tumorales A375 EGFR+ A375 por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Luego se agregaron anticuerpos a concentraciones finales de 1 nM y se incubaron cultivos durante 48 h a 37 °C, 5 % de CO2. Se recolectaron los sobrenadantes, se eliminaron las células y se determinaron las concentraciones de citocinas con un kit de matriz de microesferas de citocinas LEGENDplex (BioLegend, CA, EE. UU.).

Conclusiones: Los datos presentados en las Figuras 42F y 42G demuestran diferencias cuantitativas y cualitativas significativas entre la activación específica de los linfocitos T Vδ1+ y una activación más amplia de todos los linfocitos T CD3+ dentro de las PBMC no fraccionadas. Una diferencia notable es el aumento de 248 veces de los niveles de IL-17A inducido solo por TCE a base de CD3 en PBMC. Por el contrario, los linfocitos T γδ estimulados con los TCE a base de CD3 o a base de Vδ1 no producen IL-17A. IL17A es una citocina que puede potenciar el crecimiento tumoral y disminuir las respuestas inmunitarias antineoplásicas. Esto resalta el perfil de secreción de citocinas único del subconjunto de linfocitos T Vδ1+. Además, en todas las poblaciones de linfocitos T, los TCE a base de CD3 indujeron niveles significativamente mayores de muchas citocinas, particularmente TNFa. Nuevamente, esto resalta los efectos menos personalizados y más brutos (*sledgehammer*) conferidos por los TCE a base de CD3 que implican efectos de inducción más globales sobre las células CD3+.

(H) Impacto sobre la proliferación de células Vδ1+ que residen en el tejido. El siguiente análisis se enfoca en la inducción de la proliferación de las células Vδ1+ conferida por los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

Método: Se establecieron cocultivos como se indicó anteriormente con la adición de 3x10^4 linfocitos T γδ Vδ1 a 1,5x10^4 células diana EGFR+ por cavidad en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U. Antes de la adición, las células diana se tiñeron con tinte de células vivas CellTrace Violet [0,5 µM] durante 20 minutos. Las concentraciones finales de anticuerpos multiespecíficos de ensayo variaron de 2 nM a 0,25 pM. Las células se incubaron durante 5 o 7 días a 37 °C, 5 % de CO2. Se agregó medio completo con la adición de citocinas (IL-2, IL-15, IL-4 e IL-21; se necesitan unidades) el día 3 y el día 5. Las células se lavaron y se tiñeron para detectar células muertas (eFlour 780, Invitrogen) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en amortiguador FACS y se volvieron a suspender en Cell Fix (BD sciences). La cantidad de eventos se midió mediante citometría de flujo al día siguiente con el MACS Quant Analyzer 10.

Conclusiones: Este estudio demostró que el TCE a base de Vδ1 es superior de manera demostrable en lo que respecta a inducir la proliferación de linfocitos T Vδ1 en comparación con el TCE a base de CD3 equivalente, en donde el biespecífico Vδ1 induce la proliferación a dosis 10 veces menores mientras también exhibe efectos más pronunciados a concentraciones de saturación. Ver las Figuras 42H e I que resaltan los mayores efectos proliferativos conferidos por la

estimulación mediada por anticuerpo de linfocitos T Vδ1 en comparación con la estimulación a través de CD3ε.

FORMAS DE REALIZACIÓN

La presente invención incluye al menos las siguientes formas de realización numeradas:

1. Un anticuerpo multiespecífico que comprende una región Fab y una región Fc, en donde la región Fab comprende un sitio de fijación específico para un epítopo de la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ; y la región Fc comprende un sitio de fijación a EGFR.

2. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 1, en donde el sitio de fijación a EGFR no es proporcionado por un dominio CH3 en el que

a. los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP (SEQ ID NO: 523), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

b. los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP (SEQ ID NO: 523) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

c. los residuos 359 a 362 (numeración EU) comprenden EEGP (SEQ ID NO: 523), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 415 (numeración EU) comprenden SYW (SEQ ID NO: 533);

d. los residuos 358 a 361, 361.1 y 362 (numeración EU) comprenden LDEEGP (SEQ ID NO: 542), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWVK (SEQ ID NO: 543);

e. los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK (SEQ ID NO: 512);

f. los residuos 358 a 362 (numeración EU) comprenden TDDGP (SEQ ID NO: 560), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden TYG (SEQ ID NO: 511) y los residuos 413 a 419 (numeración EU) comprenden SYWRWYK (SEQ ID NO: 512); o

g. los residuos 358 a 362 (numeración EU) comprenden TESGP (SEQ ID NO: 553), los residuos 384 a 386 (numeración EU) comprenden KFG (SEQ ID NO: 554), los residuos 413 a 421 (numeración EU) comprenden SNLRWTKGH (SEQ ID NO: 555), y el residuo 378 es valina.

3. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde:

a. los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman

un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

b. los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende SNGQPENNYKT (SEQ ID NO: 525) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

c. los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELEEGP (SEQ ID NO: 524), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514);

d. los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELDEGGP (SEQ ID NO: 544), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWVKGNV (SEQ ID NO: 545);

e. los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDELTKNQ (SEQ ID NO: 513), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514) y los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515);

f. los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDETDDGP (SEQ ID NO: 561), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende STYGPENNYKT (SEQ ID NO: 514), los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SYWRWYKGNV (SEQ ID NO: 515); o

g. los residuos 355 a 362 (numeración EU) forman un bucle AB que comprende RDETESGP (SEQ ID NO: 556), los residuos 383 a 391 (numeración EU) forman un bucle CD que comprende SKFGPENNYKT (SEQ ID NO: 557), los residuos 413 a 422 (numeración EU) forman un bucle EF que comprende SNLRWTKGHV (SEQ ID NO: 558).

4. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 1, en donde el dominio CH3 es un dominio CH3 de IgG humana diseñado por ingeniería genética para comprender el sitio de fijación a EGFR.

5. Un anticuerpo de acuerdo con la forma de realización 2, en donde la región Fc es una región Fc de IgG humana que comprende el dominio CH3 diseñado por ingeniería genética para comprender el sitio de fijación a EGFR.

6. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 es al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o 100 % idéntica a:

a. SEQ ID NO: 562;

b. SEQ ID NO: 522;

c. SEQ ID NO: 532;

d. SEQ ID NO: 541;

e. SEQ ID NO: 510;

f. SEQ ID NO: 559; o

g. SEQ ID NO: 552.

7. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo está habilitado por Fc.

8. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el dominio constante de la cadena pesada comprende:

a. SEQ ID NO: 391 o SEQ ID NO: 392;

b. SEQ ID NO: 520 o SEQ ID NO: 521;

c. SEQ ID NO: 530 o SEQ ID NO: 531;

d. SEQ ID NO: 539 o SEQ ID NO: 540;

e. SEQ ID NO: 508 o SEQ ID NO: 509;

f. SEQ ID NO: 385 o SEQ ID NO: 386; o

g. SEQ ID NO: 550 o SEQ ID NO: 551.

9. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, que comprende:

a. SEQ ID NO: 389; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 432;

b. SEQ ID NO: 400; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 436;

c. SEQ ID NO: 516; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 518;

d. SEQ ID NO: 517; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 519;

e. SEQ ID NO: 526; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 528;

f. SEQ ID NO: 527; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 529;

g. SEQ ID NO: 535; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 537;

h. SEQ ID NO: 536; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 538;

i. SEQ ID NO: 504; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 506;

j. SEQ ID NO: 505; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 507;

k. SEQ ID NO: 388; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 431;

l. SEQ ID NO: 399; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 435;

m. SEQ ID NO: 546; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 548;

n. SEQ ID NO: 547; o SEQ ID NO: 414; y SEQ ID NO: 549;

o. SEQ ID NO: 378; o SEQ ID NO: 425; y SEQ ID NO: 426;

p. SEQ ID NO: 379; o SEQ ID NO: 421; y SEQ ID NO: 437;

q. SEQ ID NO: 380; o SEQ ID NO: 423; y SEQ ID NO: 427;

10. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fc de este se fija a EGFR humano con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 150 nM.

11. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fc de este se fija a EGFR humano con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 20 nM.

12. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fc de este se fija a EGFR humano con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 10 nM.

13. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fc de este se fija a EGFR humano con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 5 nM.

14. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fc de este se fija a EGFR con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 3 nM.

15. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 55 a 78 y 133 a 143; y/o

una región variable de la cadena liviana que comprende una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 82 a 105 y 147 a 157.

16. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 15, en donde la

región Fab comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende:

una VHCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51, 52 y 130.

una VHCDR2 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 53 y 131; y

una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 55 a 78 y 133 a 143; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende:

una VLCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 79 y 144;

una VLCDR2 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 80 y 145; y

una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 82 a 105 y 147 a 157.

17. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 15 o 16, en donde la región Fab comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 25 y 107 a 117; y/o

una región variable de cadena liviana que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 50 y 119 a 129.

18. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una de las formas de realización 1 a 10, en donde la región Fab comprende:

a. una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 55 a 78; y/o

b. una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 82 a 105.

19. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende:

a. una VHCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 55 a 78; y/o

b. una VLCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 82 a 105

20. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende:

a. una VHCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52;

b. una VHCDR2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 53;

c. una VLCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 79; y/o

d. una VLCDR2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 80.

21. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior,

en donde la región Fab comprende:

a. una VHCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52;

b. una VHCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53;

c. una VLCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79; y/o

d. una VLCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80.

22. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende:

a. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 55, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 82, respectivamente;

b. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 56, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 83, respectivamente;

c. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 57, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprende o consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 84, respectivamente;

d. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 58, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 85, respectivamente;

e. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 59, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 86, respectivamente;

f. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 60, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprende o consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 87, respectivamente;

g. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 61, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 88, respectivamente;

h. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 62, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 89, respectivamente;

i. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 63, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 90, respectivamente;

j. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 64, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 91, respectivamente;

k. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 65, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 92, respectivamente;

l. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 66, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 93, respectivamente;

m. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 67, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 94, respectivamente;

n. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 68, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 95, respectivamente;

o. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 69, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ

ID NO: 79, 80 y 96, respectivamente;

p. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 70, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 97, respectivamente;

q. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 71, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 98, respectivamente;

r. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 72, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 99, respectivamente;

s. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 73, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 100, respectivamente;

t. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 74, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 101, respectivamente;

u. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 75, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 102, respectivamente;

v. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 76, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 103, respectivamente;

w. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 77, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 104, respectivamente; o

x. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 53 y 78, respectivamente, y una VLCDR1, una

VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80 y 105, respectivamente.

23. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende

a. una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 a 25; y/o

b. una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27 a 50.

24. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende:

a. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 25; y/o

b. una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 27 a 50.

25. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende:

a. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27;

b. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 28;

c. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29;

d. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 30;

e. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID

NO: 31;

f. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 32;

g. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 33;

h. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34;

i. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 35;

j. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 11 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 36;

k. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 37;

l. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38;

m. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 39;

n. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende o consiste

en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 40;

o. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 16 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41;

p. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 17 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;

q. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 18 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;

r. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 19 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 44;

s. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 45;

t. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 21 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 46;

u. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 22 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 47;

v. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 23 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 48;

w. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 49; o

x. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 50.

26. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende:

a. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27;

b. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;

c. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29;

d. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;

e. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;

f. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;

g. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;

h. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;

i. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;

j. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

k. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

l. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;

m. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39;

n. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40;

o. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41;

p. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;

q. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;

r. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;

s. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45;

t. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;

u. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47;

v. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48;

w. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; o

x. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

27. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende un residuo de aminoácido distinto de serina en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT.

28. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 27, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, metionina, leucina e isoleucina.

29. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 27, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

30. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 27, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, valina, metionina, leucina e isoleucina.

31. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 27, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT es un residuo de leucina.

32. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se selecciona del grupo que consiste en ADT1-4-105, ADT1-4-107, ADT1-4-110, ADT1-4-112, ADT1-4-117, ADT1-4-19, ADT1-4-21, ADT1-4-31, ADT1-4-139, ADT1-4-4, ADT1-4-143, ADT1-4-53, ADT1-4-173, ADT1-4-2, ADT1-4-8, ADT1-4-82, ADT1-4-83, ADT1-4-3, ADT1-4-84, ADT1-4-86, ADT1-4-95, ADT1-4-1, ADT1-4-6 y ADT1-4-138.

33. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 32, en donde la región Fab comprende de 1 a 10, de 1 a 5 o de 1 a 2 sustituciones de aminoácidos en las 6 regiones de CDR.

34. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 32 o 33, en donde la región Fab comprende hasta 2 o hasta 1 sustitución de aminoácidos en las 6 regiones de CDR.

35. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 32 a 34, en donde la región Fab comprende 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en las 6 regiones de CDR.

36. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 32 a 35, en donde la región Fab comprende de 1 a 10, de 1 a 5 o de 1 a 2 sustituciones de aminoácidos en una o más regiones de marco.

37. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 32 a 36, en donde la región Fab comprende hasta 2 o hasta 1 sustitución de aminoácidos en una o más regiones de marco.

38. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 36 a 37, en donde la región Fab comprende 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en una o más regiones de marco.

39. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 32 a 39, en donde las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras.

40. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende:

a. una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de GDSVSSKSX_1A;

b. una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 53

c. una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia $X_2WX_3X_4X_5X_6DX_7$, en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 54;

d. una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 79;

e. una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 80; y

f. una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia $QQX_8YX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}T$, en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 81;

en donde cada uno de X_1 a X_{13} es un aminoácido natural.

41. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 40, en donde:

a. X_1 se selecciona del grupo que consiste en A y V;

b. X_2 se selecciona del grupo que consiste en S y T;

c. X_3 se selecciona del grupo que consiste en V, A y L;

d. X_4 se selecciona del grupo que consiste en G, E y D;

e. X_5 se selecciona del grupo que consiste en Y y N;

f. X_6 se selecciona del grupo que consiste en V, A y P;

g. X_7 se selecciona del grupo que consiste en V, Y y R;

h. X_8 se selecciona del grupo que consiste en K, R y G;

i. X_9 se selecciona del grupo que consiste en S y K;

j. X_{10} se selecciona del grupo que consiste en T, Q, A, E y D;

k. X_{11} se selecciona del grupo que consiste en P, H y D;

l. X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Q, R, K, W, P, E e I; y

m. X_{13} se selecciona del grupo que consiste en I, V y L.

42. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 40 o la forma de realización 41, en donde la región Fab comprende además:

n. una secuencia de HFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 170 o 171;

o. una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 172;

p. una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 173;

q. una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 174;

r. una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 175;

s. una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 176;

t. una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 177 o 178; y

u. una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 179, 180, 181 o 182.

43. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab de este:

a. se fija a TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 o 306) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);

b. se fija opcionalmente a TRDV1 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 308) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM (preferentemente menor de alrededor de 50 nM); y/o

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM).

d. .

44. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab de este:

a. se fija a TRDV1 humana con una KD menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);

b. se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una KD menor de alrededor de 100 nM (preferentemente menor de alrededor de 50 nM); y/o

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM) y una IC90 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 100 nM (menor de alrededor de 50 nM).

45. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde:

a. la región Fab de este se fija a TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 o 306) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM (preferentemente menor de alrededor de 50 nM);

b. opcionalmente, la región Fab de este se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 308) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM (preferentemente menor de alrededor de 50 nM);

y/o

c. la región Fc de este se fija a EGFR humano con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 150 nM (preferentemente menor de alrededor de 50 nM).

46. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde los anticuerpos multiespecíficos se fijan específicamente a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 5 nM y se fijan específicamente a EGFR humano con una K_D menor de alrededor de 150 nM, menor de alrededor de 20 nM, menor de alrededor de 10 nM o menor de alrededor de 5 nM.

47. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde los anticuerpos multiespecíficos se fijan específicamente a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 5 nM y se fijan específicamente a EGFR humano con una K_D menor de alrededor de 5 nM.

48. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 40, en donde:

a. X_1 se selecciona del grupo que consiste en A y V;

b. X_2 se selecciona del grupo que consiste en S y T;

c. X_3 se selecciona del grupo que consiste en V, A y L;

d. X_4 se selecciona del grupo que consiste en G, E y D;

e. X_5 se selecciona del grupo que consiste en Y y N;

f. X_6 se selecciona del grupo que consiste en V, A y P;

g. X_7 se selecciona del grupo que consiste en V, Y y R;

h. X_8 se selecciona del grupo que consiste en K, R y G;

i. X_9 se selecciona del grupo que consiste en S y K;

j. X_{10} se selecciona del grupo que consiste en T, Q, A, E y D;

k. X_{11} se selecciona del grupo que consiste en P y H;

l. X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Q, R, K, W, P, E e I; y

m. X_{13} se selecciona del grupo que consiste en I, V y L.

49. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 48, en donde la región Fab comprende además:

a. una secuencia de HFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 170 o 171;

b. una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 172;

c. una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 173;

d. una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 174;

e. una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 175;

f. una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 176;

g. una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 177; y

h. una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 179, 180, 181 o 182.

50. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab de este:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM);

b. se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente menor de alrededor de 0,5 nM).

51. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 40, en donde:

a. X_1 se selecciona del grupo que consiste en A y V;

b. X_2 se selecciona del grupo que consiste en S y T;

c. X_3 se selecciona del grupo que consiste en V, A y L;

d. X_4 se selecciona del grupo que consiste en G y D;

e. X_5 se selecciona del grupo que consiste en Y y N;

f. X_6 se selecciona del grupo que consiste en V, A y P;

g. X_7 se selecciona del grupo que consiste en V, Y y R;

h. X_8 se selecciona del grupo que consiste en K y R;

i. X_9 se selecciona del grupo que consiste en S y K;

j. X_{10} se selecciona del grupo que consiste en T, Q, A y E;

k. X_{11} se selecciona del grupo que consiste en P y H;

l. X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Q, K, W, P e I; y

m. X_{13} se selecciona del grupo que consiste en V y L.

52. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 51, en donde la región Fab comprende además:

a. una secuencia de HFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO:

170 o 171;

b. una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 172;

c. una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 173;

d. una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 174;

e. una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 175;

f. una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 176;

g. una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 177; y

h. una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 179 o 181.

53. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab de este:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM);

b. se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 50 nM;

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente menor de alrededor de 0,5 nM).

54. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el epítopo que se fija a la región Fab comprende uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37-53 y/o 59-77 de SEQ ID NO: 272.

55. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el epítopo que se fija a la región Fab de este comprende los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272.

56. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el epítopo que se fija a la región Fab consiste en los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272.

57. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una de las formas de realización 1 a 10, en donde la región Fab comprende:

a. una VHCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 133 a 143; y/o

b. una VLCDR3 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 147 a 157.

58. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 57, en donde la región Fab comprende:

c. una VHCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 133 a 143; y/o

d. una VLCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 147 a 157.

59. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 58, en donde la región Fab comprende además:

a. una VHCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 130;

b. una VHCDR2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 131;

c. una VLCDR1 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 144; y/o

d. una VLCDR2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 145.

60. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende además:

a. una VHCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130;

b. una VHCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131;

c. una VLCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144; y/o

d. una VLCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145.

61. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 60, en donde la región Fab comprende:

a. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 133, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 147, respectivamente;

b. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las

secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 134, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 148, respectivamente;

c. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 135, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 149, respectivamente;

d. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 136, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 150, respectivamente;

e. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 137, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 151, respectivamente;

f. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 138, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprende o consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 152, respectivamente;

g. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 139, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprende o consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 153, respectivamente;

h. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 140, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 154, respectivamente;

i. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 141, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 155, respectivamente;

j. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 142, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 156, respectivamente; o

k. una VHCDR1, una VHCDR2 y una VHCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, 131 y 143, respectivamente, y una VLCDR1, una VLCDR2 y una VLCDR3 que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, 145 y 157, respectivamente;

62. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 61, en donde la región Fab comprende:

a. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 107 a 117; y/o

b. una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 119 a 129.

63. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 62, en donde la región Fab comprende:

a. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 107 a 117; y/o

b. una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 119 a 129.

64. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 63, en donde la región Fab comprende:

a. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 107 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 119;

b. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 108 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 120;

c. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 109 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 121;

d. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 110 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 122;

e. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 111 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 123;

f. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 112 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 124;

g. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 113 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 125;

h. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 114 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 126;

i. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 115 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 127;

j. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 116 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 128; o

k. una VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 117 y una VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 129.

65. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 64, en donde la región Fab comprende:

a. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119;

b. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120;

c. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121;

d. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122;

e. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123;

f. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124;

g. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125;

h. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 126;

i. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 127;

j. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128; o

k. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129.

66. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 65, en donde la región Fab comprende una secuencia variable de la cadena liviana kappa que tiene un residuo de aminoácido distinto de serina en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT.

67. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 66, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la secuencia variable de la cadena liviana es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, metionina, leucina e isoleucina.

68. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 66, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la secuencia variable de la cadena liviana es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

69. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 66, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la secuencia variable de la cadena liviana es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, valina, metionina, leucina e isoleucina.

70. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 66, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la secuencia variable

de la cadena liviana es un residuo de leucina.

71. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 70, en donde la región Fab se selecciona del grupo que consiste en ADT1-7-10, ADT1-7-15, ADT1-7-17, ADT1-7-18, ADT1-7-19, ADT1-7-20, ADT1-7-22 ADT1-7-23, ADT1-7-42, ADT1-7-3 y ADT1-7-61.

72. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 71, en donde la región Fab comprende de 1 a 10, de 1 a 5 o de 1 a 2 sustituciones de aminoácidos en las 6 regiones de CDR.

73. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 71 o 72, en donde la región Fab comprende hasta 2 o hasta 1 sustitución de aminoácidos en las 6 regiones de CDR.

74. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 73, en donde la región Fab comprende 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en las 6 regiones de CDR.

75. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 74, en donde la región Fab comprende de 1 a 10, de 1 a 5 o de 1 a 2 sustituciones de aminoácidos en una o más regiones de marco.

76. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 75, en donde la región Fab comprende hasta 2 o hasta 1 sustitución de aminoácidos en una o más regiones de marco.

77. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 76, en donde la región Fab comprende 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en una o más regiones de marco.

78. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 6077, en donde las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras.

79. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una de las formas de realización 1 a 14, en donde la región Fab comprende:

a. una secuencia de HCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 130

b. una secuencia de HCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 131

c. una secuencia de HCDR3 que comprende o consiste en la secuencia $X_1X_2YX_3X_4$AFDI, en donde la secuencia de HCDR3 no es SEQ ID NO: 132;

d. una secuencia de LCDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID

NO: 144;

e. una secuencia de LCDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 145; y

f. una secuencia de LCDR3 que comprende o consiste en la secuencia de $QQX_5X_6X_7X_8LX_9T$, en donde la secuencia de LCDR3 no es SEQ ID NO: 146;

en donde cada uno de X_1 a X_9 es un aminoácido natural.

80. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 79, en donde:

a. X_1 se selecciona del grupo que consiste en D, I y V;

b. X_2 se selecciona del grupo que consiste en D y S;

c. X_3 se selecciona del grupo que consiste en N, E, D, Q y A;

d. X_4 se selecciona del grupo que consiste en D y E;

e. X_5 se selecciona del grupo que consiste en T y S;

f. X_6 se selecciona del grupo que consiste en A, G, Y e S;

g. X_7 se selecciona del grupo que consiste en S y D;

h. X_8 se selecciona del grupo que consiste en T, E y G; y

i. X_9 se selecciona del grupo que consiste en L y D.

81. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 79 o la forma de realización 80, en donde la región Fab comprende además:

a. una secuencia de HFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 189;

b. una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 190;

c. una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 191;

d. una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 192;

e. una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 193 y 194;

f. una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 195;

g. una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 196; y

h. una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 197.

82. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de

realización 57 a 81, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM);

b. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM).

83. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 79, en donde:

a. X_1 se selecciona del grupo que consiste en D y V;

b. X_2 se selecciona del grupo que consiste en D y S;

c. X_3 se selecciona del grupo que consiste en D, Q y A;

d. X_4 se selecciona del grupo que consiste en D y E;

e. X_5 es S;

f. X_6 se selecciona del grupo que consiste en A e Y;

g. X_7 es S;

h. X_8 se selecciona del grupo que consiste en E y G; y

i. X_9 se selecciona del grupo que consiste en L y D.

84. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 83, en donde la región Fab comprende además:

a. una secuencia de HFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 189;

b. una secuencia de HFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 190;

c. una secuencia de HFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 191;

d. una secuencia de HFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 192;

e. una secuencia de LFR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 193;

f. una secuencia de LFR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 195;

g. una secuencia de LFR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 196; y

h. una secuencia de LFR4 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 197.

85. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 84, en donde la región Fab de este:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 5 nM); y/o

b. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 5 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM).

.

c. .

86. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 85, en donde el epítopo que se fija a la región Fab comprende uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 5-20 y/o 62-77 de SEQ ID NO: 271.

87. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 86, en donde el epítopo que se fija a la región Fab comprende los residuos de aminoácidos 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 y 77 de SEQ ID NO: 272.

88. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 57 a 87, en donde el epítopo que se fija a la región Fab consiste en los residuos de aminoácidos 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 y 77 de SEQ ID NO: 272.

89. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 14, en donde la región Fab deriva de una variante con maduración de afinidad de un anticuerpo anti-Vδ1 parental, en donde el anticuerpo anti-Vδ1 parental comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

90. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 89, en donde la región Fab es como se define en cualquier forma de realización anterior.

91. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab de este:

a. se fija a TRDV1 humana con una KD menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);

b. se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una KD menor de alrededor de 100 nM (preferentemente menor de alrededor de 50 nM); y/o

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM).

92. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM);

b. se fija a TRDV1 de Macaca fascicularis con una KD menor de alrededor de 100 nM

(preferentemente menor de alrededor de 50 nM); y/o

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente menor de alrededor de 0,5 nM).

93. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM);

b. se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 50 nM; y/o

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente menor de alrededor de 0,5 nM).

94. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 14, en donde la región Fab deriva de una variante con maduración de afinidad de un anticuerpo anti-Vδ1 parental, en donde el anticuerpo anti-Vδ1 parental o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118.

95. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 94, en donde la región Fab es como se define en cualquier forma de realización anterior.

96. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 5 nM); y/o

b. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM).

97. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 5 nM); y/o

b. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 5 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM).

98. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 14, en donde la región Fab es una variante con maduración de afinidad de un anticuerpo anti-Vδ1 parental, en donde el anticuerpo anti-Vδ1 parental o fragmento de fijación al antígeno de este comprende:

a. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

273 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 282;

b. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 283;

c. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 275 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 284;

d. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 276 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 285;

e. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 277 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 286;

f. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 278 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 287;

g. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 288;

h. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 280 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 289;

i. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 290; o

j. una VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 312 y una VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 313.

99. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la variante con maduración de afinidad tiene una afinidad al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 500 % o, con mayor preferencia, al menos alrededor de 1000 % mayor que aquella con la que el anticuerpo parental se fija a una cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ, por ejemplo, como se mide según la Kd.

100. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la variante con maduración de afinidad comprende secuencias de VH y VL que son al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 96 % idénticas a las secuencias de VH y VL parentales correspondientes.

101. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la variante con maduración de afinidad comprende hasta 20, por ejemplo, hasta 15, por ejemplo, hasta 10 sustituciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de anticuerpo parental.

102. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 14, en donde la región Fab comprende una secuencia variable de la cadena liviana

kappa, en la que el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT no es un residuo de serina.

103. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 102, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, metionina, leucina e isoleucina.

104. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 102, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

105. El anticuerpo multiespecífico de este de acuerdo con la forma de realización 102, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, valina, metionina, leucina e isoleucina.

106. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 102, en donde el residuo en la posición 74 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT es un residuo de leucina.

107. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.

108. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

109. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y la región Fc comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 562.

110. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y la región Fc comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 522.

111. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y la región Fc comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 532.

112. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior,

en donde la región Fab comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y la región Fc comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 541.

113. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y la región Fc comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 510.

114. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y la región Fc comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 559.

115. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y la región Fc comprende un dominio CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 552.

116. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija específicamente a una cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T γδ (TCR) y compite por la fijación a la cadena variable delta 1 (Vδ1) de un receptor de linfocitos T γδ (TCR) con un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores.

117. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo está habilitado por Fc.

118. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, caracterizado porque:

a. causa la regulación descendente de TCR en los linfocitos T Vδ1 a los que se fija;

b. no exhibe CDC o ADCC; y

c. no agota los linfocitos T Vδ1.

119. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 118, en donde el anticuerpo causa un agotamiento menor de alrededor de 30 %, menor de alrededor de 20 % o menor de alrededor de 10 % de la población de linfocitos T+ Vδ1 viable a través de ADCC y/o CDC.

120. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 118, en donde el anticuerpo no induce la secreción de IL-17A.

121. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 118, en donde el anticuerpo induce menos de alrededor de 30 %, menos de alrededor de 20 % o menos de alrededor de 10 % de la secreción de IL-17A inducida por anticuerpos CD3 equivalentes.

122. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualesquier formas de realización anteriores, en donde la región Fab se fija a TRVD1 humana con una KD menor de alrededor de 10 nM.

123. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualesquier formas de realización anteriores, en donde la región Fab se fija a TRVD1 humana con una KD menor de alrededor de 5 nM.

124. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualesquier formas de realización anteriores, en donde la región Fab se fija a TRVD1 de *Macaca fascicularis* con una KD menor de alrededor de 100 nM.

125. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 115, en donde la región Fab se fija a TRVD1 de *Macaca fascicularis* con una KD menor de alrededor de 50 nM.

126. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija específicamente a una cadena variable delta 1 (Vδ1) humana de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ con una KD menor de alrededor de 10 nM.

127. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab es como se define en cualquiera de las formas de realización 1 a 126.

128. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija a una cadena variable delta 1 (Vδ1) de *Macaca fascicularis* de un receptor de linfocitos T (TCR) γδ con una KD menor de alrededor de 100 nM o menor de alrededor de 50 nM.

129. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM, preferentemente menor de alrededor de 10 nM.

130. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo multiespecífico tiene una IC50 para la inactivación de células A375 menor de alrededor de 10 nM, preferentemente menor de alrededor de 5 nM.

131. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab estimula la proliferación de linfocitos T Vδ1.

132. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior,

en donde la región Fab se fija a TVRD1 humana con una K_D menor de alrededor de 100 nM.

133. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija a TVRD1 humana con una K_D menor de alrededor de 50 nM.

134. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM.

135. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 5 nM.

136. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 1 nM.

137. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 100 nM.

138. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija a TRDV1 de Macaca fascicularis con una K_D menor de alrededor de 50 nM.

139. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM, menor de alrededor de 10 nM, menor de alrededor de 5 nM, menor de alrededor de 1 nM o menor de alrededor de 0,5 nM.

140. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana (SEQ ID NO: 272 o 306) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);

b. se fija opcionalmente a TRDV1 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 308) con una afinidad de fijación (K_D, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones superficiales) menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM).

141. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);

b. se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 100 nM (preferentemente, menor de alrededor de 50 nM);

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM) y una IC90 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 100 nM (menor de alrededor de 50 nM).

142. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente menor de alrededor de 5 nM); y/o

b. se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 100 nM (preferentemente menor de alrededor de 50 nM).

143. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 1 nM);

b. se fija a TRDV1 de *Macaca fascicularis* con una K_D menor de alrededor de 50 nM;

c. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 1 nM (preferentemente menor de alrededor de 0,5 nM).

144. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM);

b. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 50 nM (preferentemente menor de alrededor de 10 nM).

145. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab:

a. se fija a TRDV1 humana con una K_D menor de alrededor de 10 nM (preferentemente, menor de alrededor de 5 nM);

b. tiene una IC50 para la regulación descendente de TCR menor de alrededor de 5 nM (preferentemente menor de alrededor de 1 nM); y

c. .

146. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab es una región Fab humana.

147. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo es un mAb^2.

148. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

149. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab solo se fija a un epítopo en la región V de una cadena Vδ1 de un TCR γδ.

150. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija solo a un epítopo dentro de los residuos de aminoácidos 1-90 de SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 306 o SEQ ID NO: 308.

151. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab no se fija a un epítopo encontrado en CDR3 de una cadena Vδ1 de un TCR γδ.

152. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab de este no se fija a un epítopo dentro de las regiones de aminoácidos 91-105 (CDR3) de SEQ ID NO: 272.

153. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la región Fab se fija a un epítopo dentro de las regiones de aminoácidos

(i) 3-20 de SEQ ID NO: 272; y/o

(ii) 37-77 de SEQ ID NO: 272.

154. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 153, en donde el epítopo que se fija a la región Fab comprende uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 37-53 y/o 59-77 de SEQ ID NO: 272.

155. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 153, en donde el epítopo que se fija a la región Fab comprende los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272.

156. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 153, en donde el epítopo que se fija a la región Fab consiste en los residuos de aminoácidos 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 y 77 de SEQ ID NO: 272.

157. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 153, en donde el epítopo que se fija a la región Fab comprende uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 5-20 y/o 62-77 de SEQ ID NO: 272.

158. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 153, en donde el epítopo que se fija a la región Fab comprende los residuos de aminoácidos 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 y 77 de SEQ ID NO: 272.

159. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 153, en donde el epítopo que se fija a la región Fab consiste en los residuos de aminoácidos 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 y 77 de SEQ ID NO: 272.

160. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 153, en donde el epítopo que se fija a la región Fab es un epítopo activador de un linfocito T γδ.

161. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la forma de realización 160, en donde la fijación del epítopo activador: (i) regula de manera descendente el TCR γδ; (ii) activa la desgranulación del linfocito T γδ; y/o (iii) promueve la inactivación mediada por linfocitos T γδ.

162. El anticuerpo multiespecífico de este de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde la fijación del epítopo activador regula de manera ascendente la expresión de CD107a, CD25, CD69 y/o Ki67.

163. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo multiespecífico es mayor de alrededor de 70 KDa.

164. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo no comprende una VHCDR3 que tiene SEQ ID NO: 54 y una VLCDR3 que tiene SEQ ID NO: 81, y/o en donde el anticuerpo no comprende una VHCDR3 que tiene SEQ ID NO: 132 y una VLCDR3 que tiene SEQ ID NO: 146.

165. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el anticuerpo no comprende una región VH que tiene SEQ ID NO: 1 y una región VL que tiene SEQ ID NO: 26, y/o en donde el anticuerpo no comprende una región VH que tiene SEQ ID NO: 106 y una región VL que tiene SEQ ID NO: 118.

166. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo multiespecífico como se define en cualquier forma de realización anterior.

167. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el primer dominio de fijación anti-Vδ1 que comprende una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 199 a 222, 224 a 247, 249 a 259 o 261 a 271.

168. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos como se define en la forma de realización 166 o la forma de realización 167.

169. Una célula huésped que comprende la secuencia de polinucleótidos como se define en la forma de realización 166 o la forma de realización 167 o el vector de expresión como se define en la forma de realización 168, en donde la célula huésped es opcionalmente una célula huésped recombinante.

170. La célula huésped de acuerdo con la forma de realización 169, que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de VH y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de VL.

171. La célula huésped de acuerdo con la forma de realización 169, que comprende un primer vector de expresión que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de VH y un segundo vector de expresión que comprende una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de VL.

172. La célula huésped de acuerdo con la forma de realización 169, que comprende un

vector de expresión que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de VH y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de VL.

173. La célula huésped como se define en cualquiera de las formas de realización 169 a 172, en donde el polinucleótido o vector de expresión codifica un anclaje de membrana o dominio transmembrana fusionado al anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este se presenta en una superficie extracelular de la célula.

174. Un método para producir cualquier anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 165, que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 169 a 173 en un medio de cultivo celular.

175. El método de acuerdo con la forma de realización 174, que comprende además aislar el anticuerpo multiespecífico del medio de cultivo.

176. Una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico o el fragmento de fijación al anticuerpo de este como se define en cualquiera de las formas de realización 1 a 165.

177. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico como se define en cualquiera de las formas de realización 1 a 165 y un diluyente o portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

178. Un kit que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 165 o una composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización 177.

179. El kit de acuerdo con la forma de realización 178, que comprende además un agente terapéuticamente activo adicional.

180. El kit de acuerdo con la forma de realización 178 o la forma de realización 179, que comprende además instrucciones para su uso.

181. Un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 165, o la composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización 177.

182. El método de acuerdo con la forma de realización 181, en donde la enfermedad o trastorno es cáncer.

183. El método de acuerdo con la forma de realización 182, en donde el tipo de cáncer es un cáncer EGFR positivo.

184. El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 181 a 183, que comprende además administrar simultánea o secuencialmente en cualquier orden un segundo agente al sujeto.

185. Un método para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende

administrar al sujeto un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 165, o la composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización 177.

186. El método de acuerdo con la forma de realización 185, en donde el sujeto tiene cáncer.

187. El método de acuerdo con la forma de realización 185 o 186, en donde modular una respuesta inmunitaria en un sujeto comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en activar los linfocitos T γδ, causar o aumentar la proliferación de los linfocitos T γδ, causar o aumentar la expansión de los linfocitos T γδ, causar o aumentar la desgranulación de los linfocitos T γδ, causar o aumentar la actividad de inactivación mediada por linfocitos T γδ, causar o aumentar la citotoxicidad de los linfocitos T γδ, causar o aumentar la movilización de los linfocitos T γδ, aumentar la supervivencia de los linfocitos T γδ y aumentar la resistencia al agotamiento de los linfocitos T γδ.

188. El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 181 a 187, en donde las células enfermas se inactivan y las células sanas se preservan.

189. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 165, o la composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización 177, o el kit de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 178 a 179 para su uso en medicina.

190. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 165, o la composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización 177, o el kit de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 178 a 179 para su uso en el tratamiento contra el cáncer.

191. El uso de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 165 en la elaboración de un medicamento.

192. El uso de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 165 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento contra el cáncer.