

PROTEÍNAS DE UNIÓN A TRGV9, Y SU USO MÉDICO

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente china No. CN202311518247.8, presentada el 15 de noviembre de 2023.

Campo de la Invención

La presente divulgación se refiere al campo de los productos biofarmacéuticos y, en particular, a una proteína de unión a TRGV9 y una proteína de unión a GPC3/TRGV9, un método para tratar el cáncer utilizando las mismas y su uso farmacéutico.

Antecedentes de la Invención

Las células T $\gamma\delta$ son un grupo de células T que reconocen de forma natural y pueden destruir las células tumorales. Tienen tanto una función de presentación de antígenos como una función destructora, tendiendo un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. A diferencia del TCR $\alpha\beta$, el TCR de las células T $\gamma\delta$ consta de dos cadenas: una cadena γ y una cadena δ , y su reconocimiento de antígenos no está restringido por el MHC (Exp Mol Med. Marzo de 2021; 53(3):318-327). El número de células T $\gamma\delta$ es relativamente pequeño: representan entre el 1 % y el 5 % de las PBMC. Según la cadena δ , se pueden clasificar en cuatro clases: $\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$ y $\delta 5$ (Front Immunol. 16 de junio de 2022; 13:915837). $\delta 1$ y $\delta 2$ son las más abundantes de las cuatro clases. $\delta 1$ puede emparejarse con diferentes cadenas γ para formar distintos TCR y se distribuye principalmente en tejidos como la piel y las mucosas. $\delta 2$ se empareja principalmente con $\gamma 9$ para formar un subtipo $\gamma 9\delta 2$, se distribuye principalmente en la sangre periférica y representa hasta el 95 % del número total de células T $\gamma\delta$ en la sangre periférica (Front Immunol. 16 de junio de 2022; 13:915837).

Las células T $\gamma\delta$ desempeñan un papel importante en la lucha contra los tumores. Cuentan con diversos mecanismos para destruir las células tumorales, entre los que se incluyen el reconocimiento del complejo BTN2A/BTN3A activado por antígenos fosforilados en las células diana a través de los TCR y el inicio de una señal de destrucción para cumplir su función letal. Además, existen vías de destrucción similares a las de las células NK, en las que se expresan receptores como el NKG2D en la superficie celular, y los efectos de destrucción tumoral se producen mediante la unión a los ligandos correspondientes en las células tumorales. Las células T $\gamma\delta$ se infiltran en diversos tumores en distintos grados. Según un análisis de una amplia muestra de 25 tipos de tumores y 5782 tumores, la presencia de infiltración de células T $\gamma\delta$ se asocia con un pronóstico favorable para el paciente, y son las más favorables de todas las poblaciones de células inmunitarias. De manera similar, un análisis de 3238 muestras de 14

tumores sólidos no cerebrales muestra que su infiltración en los tumores es indicativa de un buen pronóstico (Oncoimmunology. 6 de febrero de 2017; 6(3):e1284723). Los primeros estudios clínicos sobre las células T $\gamma\delta$ se centraron principalmente en la activación *in vivo* o en la reinfusión de células expandidas *in vitro*. Aunque diferentes estudios mostraron efectos antitumorales relativamente limitados, no se notificaron efectos secundarios graves, lo que sugiere que las células T $\gamma\delta$ tienen una buena seguridad.

El glipicano-3 (GPC3) es un objetivo potencial para el tratamiento del cáncer de hígado. En 2020, se registraron 900,000 nuevos casos de cáncer de hígado y 830,000 muertes por esta causa en todo el mundo, y en China se registraron 410,000 nuevos casos y 390,000 muertes, lo que significa que aproximadamente la mitad de los casos de cáncer de hígado del mundo se produjeron en China. En los últimos años se han logrado avances significativos en los tratamientos de primera o segunda línea para el cáncer de hígado avanzado; sin embargo, sigue habiendo una falta de opciones terapéuticas eficaces para las líneas de tratamiento posteriores. El GPC3 es un proteoglicano de heparán sulfato compuesto por 580 aminoácidos, anclado a la membrana celular a través de glicosilfosfatidilinositol. El GPC3 se expresa en niveles elevados en diversos tejidos tumorales. Por ejemplo, la tasa de positividad de GPC3 en el carcinoma hepatocelular alcanza el 90 %. Por el contrario, la expresión de GPC3 en tejidos normales es muy restringida, limitándose a la placenta y al endometrio. Además, su nivel de expresión en el endometrio es mucho menor que en los tejidos tumorales, lo que lo convierte en un objetivo antitumoral ideal (Sci Transl Med. 2017 Oct 4;9(410):eaal4291).

La presente divulgación proporciona un anticuerpo dirigido contra el TCR $\gamma\delta$ con una nueva estructura de secuencia, y utiliza el anticuerpo y un dominio de unión a un antígeno asociado al tumor (por ejemplo, GPC3) (por ejemplo, un anticuerpo) para construir un anticuerpo biespecífico. Un extremo del anticuerpo biespecífico se une al TAA (p. ej., GPC3), y el otro extremo se une al $\gamma\delta$ TCR, reclutando y activando las células T $\gamma\delta$ para destruir específicamente las células tumorales positivas para el TAA (p. ej., GPC3), lo que mejora significativamente la eficacia de la terapia con células T $\gamma\delta$. El anticuerpo biespecífico de la presente divulgación presenta una buena actividad de destrucción tumoral, seguridad y capacidad de desarrollo farmacológico.

Sumario de la Invención

La presente divulgación proporciona una proteína de unión al receptor de células T (TCR) y una proteína de unión al glipicano 3 (GPC3) y al receptor de células T (TCR), los ácidos nucleicos que las codifican, un método de preparación de las mismas, y un método y uso de las mismas para el tratamiento de enfermedades.

Proteína de unión a la región variable 9 del receptor de células T (TRGV9)

La presente divulgación proporciona una proteína de unión a TRGV9. En algunas modalidades, la proteína es capaz de unirse a un TCR. En algunas modalidades, la proteína es capaz de unirse a un $\gamma\delta$ TCR. En algunas modalidades, la proteína es capaz de unirse a una cadena γ 9 del TCR. En algunas modalidades, la proteína es capaz de unirse a un TCR γ 9 δ 2. En otras modalidades, la proteína es capaz de unirse a un TCR γ 9 δ 1.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a TRGV9 que comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y/o un CDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29, por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29; o

2) una región variable de cadena pesada (VH) y/o una región variable de cadena ligera (VL), en la que la VH comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-32, y la VL comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35,

en el que los CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, IMGT, Chothia, AbM o Contact, por ejemplo, según el esquema de numeración de Kabat.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a TRGV9 que comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y/o un CDR3, en el que el CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6, el CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 7, y el CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8; o

2) un VH y/o un VL, en el que el VH comprende un HCDR1, un HCDR2 y/o un HCDR3, en el que el HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 11, el HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12, y el HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 13; el VL comprende un LCDR1, un LCDR2 y/o un LCDR3, en el que el LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, el LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, y el LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a TRGV9 que comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y un CDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 6-8, respectivamente; o

2) un VH y un VL, en los que el VH comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 11-13, respectivamente, y el VL comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 14-16, respectivamente.

En algunas modalidades, el dominio variable único de la inmunoglobulina o el VH o el VL en la proteína mencionada anteriormente se modifican genéticamente de forma independiente mediante humanización, mutación inversa, maduración de afinidad, eliminación/reducción del epítipo de células T (TCE), reducción de la desamidación del anticuerpo y/o reducción de la isomerización del anticuerpo.

En algunas modalidades, las regiones del marco de trabajo de la cadena pesada de una plantilla de la línea germinal humana utilizada para la humanización del dominio variable único de la inmunoglobulina en la proteína mencionada anteriormente se derivan de IGHV3-64; las regiones del marco de trabajo de la cadena pesada de una plantilla de la línea germinal humana utilizada para la ingeniería de humanización del VH se derivan de IGHV3-21, y las regiones del marco de trabajo de la cadena ligera de una plantilla de la línea germinal humana utilizada para la ingeniería de humanización del VL se derivan de IGKV1-12.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a TRGV9 que comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma; o

2) un VH y un VL, en los que el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-33 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con las mismas, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con las mismas.

En algunas modalidades específicas, la proteína de unión a TRGV9 comprende los siguientes VH y VL:

2-1) el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-2) el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-3) el VH comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 31 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con ella, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos descrita en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con ella;

2-4) el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma.

En la presente divulgación, «al menos un 80 % de identidad (de secuencia)» abarca al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad (de secuencia); «al menos un 90 % de identidad (de secuencia)» abarca al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad (de secuencia).

En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente comprende o es un anticuerpo anti-TRGV9 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TRGV9 o el fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo recombinante o un fragmento del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TRGV9 es un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo triespecífico).

Cuando la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, dicho dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de camélido, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina es un anticuerpo de dominio único o un VHH. A modo de ejemplo, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente es en sí misma un anticuerpo de dominio único o un VHH. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo lineal, un anticuerpo de cadena única, un nanocuerpo, un peptidocuerpo, un anticuerpo de dominio, un di-cuerpo, un tri-cuerpo, un tetra-cuerpo, un di-scFv en tándem o un tri-scFv en tándem.

Cuando la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente comprende un VH y un VL, la proteína puede ser un anticuerpo de origen murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades específicas, el fragmento de unión al antígeno incluye, entre otros, un Fab, un Fv, un sFv, un Fab', un F(ab')₂, un anticuerpo lineal, un anticuerpo de cadena única, un scFv, un sdAb, un sdFv, un nanocuerpo, un peptidocuerpo, un anticuerpo de dominio, un di-cuerpo, un tri-cuerpo, un tetra-cuerpo, un di-scFv en tándem y un tri-scFv en tándem. En algunas

modalidades específicas, el fragmento de unión al antígeno incluye un Fab, un Fv, un sFv, un Fab' y un F(ab')₂.

En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente puede comprender uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) de los dominios variables únicos de inmunoglobulina mencionados anteriormente. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden formar una molécula dimérica o multimérica. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden ser homodímeros o heterodímeros.

En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente puede comprender uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) de los VH, VL o combinaciones de los mismos mencionados anteriormente.

En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente comprende además una región Fc de inmunoglobulina humana; por ejemplo, la región Fc es una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana; por ejemplo, la región Fc se describe en la SEQ ID NO: 51 o tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma. En algunas modalidades específicas, la región Fc puede ser una región Fc con una función efectora reducida; por ejemplo, la región Fc puede comprender una mutación, y las regiones Fc de IgG ejemplares con una función efectora reducida comprenden las siguientes sustituciones: N297A o N297Q (IgG1); L234A/L235A (IgG1); V234A/G237A (IgG2); L235A/G237A/E318A (IgG4); H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2); C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1); C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1); L234F/L235E/P331S (IgG1); L234F/L235E (IgG1); L234F o L235E (IgG1); o L234A o L235A (IgG1) o S267E/L328F (IgG1). Por ejemplo, L234A/L235A significa que la secuencia comprende L234A y L235A.

En algunas modalidades, el dominio variable único de la inmunoglobulina o el VH y el VL y la región Fc en la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente están unidos, ya sea directamente o mediante un enlazador. El enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos no funcional de 1-20 o más aminoácidos que carece de una estructura secundaria o de orden superior. Por ejemplo, el enlazador está representado por (G_mS_n)_h o (G_mQ_n)_h o (GGNGT)_h (SEQ ID NO: 62) o (YGNGT)_h (SEQ ID NO: 63) o (EPKSS)_h (SEQ ID NO: 64) o (A_mS_n)_h, donde m y n se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en números enteros de 1 a 8, y h se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en números enteros de 1 a 20. Por ejemplo, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en G₄S (SEQ ID NO: 65), GS, GAP, (G₄S)₂ (SEQ ID NO: 66), (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 67), (G₄S)₄ (SEQ ID NO: 68), (G₄S)₅ (SEQ ID NO: 69), ASGS (SEQ ID NO: 70), A₃S (SEQ ID NO: 71), etc.

En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente es: una proteína que se une específicamente al TCR γδ, o un anticuerpo anti-TCR γδ o un fragmento de unión al antígeno del mismo; una proteína que se une específicamente a la cadena γ9 del TCR, o un anticuerpo contra la cadena γ9 del TCR o un fragmento de unión al antígeno del

mismo; una proteína que se une específicamente a una región variable de la cadena $\gamma 9$ del TCR (V $\gamma 9$), o un anticuerpo anti-V $\gamma 9$ TCR o un fragmento de unión a antígeno del mismo; una proteína que se une específicamente al TCR $\gamma 9\delta 2$, o un anticuerpo anti- $\gamma 9\delta 2$ TCR o un fragmento de unión a antígeno del mismo; una proteína que se une específicamente al TCR $\gamma 9\delta 1$, o un anticuerpo anti-TCR $\gamma 9\delta 1$ o un fragmento de unión al antígeno del mismo; o una proteína que se une específicamente a TRGV9, o un anticuerpo anti-TRGV9 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente comprende:

1) la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 36 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la misma; y

2) una cadena pesada y una cadena ligera, en las que la cadena pesada se describe en la SEQ ID NO: 37 o tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma, y la cadena ligera se describe en la SEQ ID NO: 38 o tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma.

En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente tiene al menos una función o propiedad seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:

(a) unión a células T $\gamma 9\delta 2$ con una EC_{50} de ≤ 10 nM, p. ej., ≤ 5 nM, ≤ 4 nM, ≤ 3 nM, ≤ 2 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.5 nM, ≤ 0.2 nM o ≤ 0.1 nM, en el que el EC_{50} se determina mediante FACS, que es un método común de determinación de afinidad en la técnica, p. ej., el método descrito en el Ejemplo 5 de la presente divulgación;

(b) unión específica a la cadena $\gamma 9$ del TCR, por ejemplo, unión específica al TCR $\gamma 9\delta 1$ o al TCR $\gamma 9\delta 2$;

(c) ausencia de unión (indetectable mediante un método de ensayo) a una cadena $\gamma 8$ del TCR, por ejemplo, ausencia de unión al TCR $\gamma 8\delta 2$;

(d) unión específica a la región variable de la cadena $\gamma 9$ del TCR (TRGV9);

(e) unión específica a un TCR quimérico V $\gamma\delta$ C $\alpha\beta$ y ausencia de unión a un TCR quimérico V $\alpha\beta$ C $\gamma\delta$; y

(f) unión a un TCR $\gamma 9\delta 2$ de mono cinomolgo;

en el que (b)-(e) pueden determinarse mediante un método de detección convencional en la técnica, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo 4 de la presente divulgación.

En algunas modalidades, la proteína mencionada anteriormente puede unirse a TRGV9 con un valor K_D de $\leq 1 \times 10^{-7}$ M, por ejemplo, $\leq 1 \times 10^{-8}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-9}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-10}$ M.

En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente comprende una variante del dominio variable único de la inmunoglobulina, en la que la variante comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29. En algunas modalidades, la proteína de unión a TRGV9 mencionada

anteriormente comprende una variante del VH y/o una variante del VL, en la que la variante del VH comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-32, y la variante del VL comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35. «Más» abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Las mutaciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras, sustituciones o modificaciones, y/o deleciones o adiciones que no afecten a la función; las mutaciones de aminoácidos pueden producirse en los CDR y/o en los FR.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se une o compite por la unión al mismo epítipo con el dominio variable único de inmunoglobulina en la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se une o compite por la unión al mismo epítipo con el VH y el VL en la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína cuya unión a TRGV9 es bloqueada por el dominio variable único de la inmunoglobulina o por el VH y el VL en la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína o molécula que comprende cualquiera de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) de los dominios variables únicos de inmunoglobulina mencionados anteriormente de la presente divulgación; por ejemplo, los dominios variables únicos de inmunoglobulina comprenden un CDR1, un CDR2 y un CDR3 establecidos en las SEQ ID NOs: 6-8, o comprenden la secuencia establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29. La proteína o molécula puede ser un conjugado o una proteína de fusión formada con otros compuestos u otros polipéptidos, y el conjugado puede comprender, por ejemplo, cualquier marcador detectable.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína o molécula que comprende cualquiera de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) de los VH y VL mencionados anteriormente en la presente divulgación; por ejemplo, los VH comprenden un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 descritos en las SEQ ID NOs: 11-13, y los VL comprenden un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 14-16, respectivamente. La proteína o molécula puede ser un conjugado o una proteína de fusión formada con otros compuestos u otros polipéptidos. Por ejemplo, el conjugado puede comprender cualquier marcador detectable.

Proteína de unión a GPC3/TRGV9

La presente divulgación proporciona una proteína que se une a GPC3 y a un TCR. En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se une a GPC3 y a un $\gamma\delta$ TCR. En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se une a GPC3 y a una cadena γ 9 del TCR. En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se une a GPC3 y a una región variable de la cadena γ 9 del TCR (V γ 9). En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se

une a GPC3 y a un TCR $\gamma\delta 2$. En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se une a GPC3 y a un TCR $\gamma\delta 1$. En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se une a GPC3 y a TRGV9. En algunas modalidades, la «unión» es simultánea o secuencial.

La presente divulgación proporciona una proteína de unión que se une a un antígeno asociado a tumores (TAA), un antígeno específico de tumores y TRGV9, que comprende un dominio de unión que se une al TAA (o al antígeno específico de tumores) y un dominio de unión que se une a TRGV9. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un primer dominio de unión a antígenos que se une específicamente al TAA (o al antígeno específico del tumor) y un segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9 es la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente de la presente divulgación. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a TRGV9 es el dominio variable único de la inmunoglobulina y/o una combinación de VH y VL en la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a GPC3/TRGV9 que comprende un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a GPC3 y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a TRGV9.

En algunas modalidades específicas, el primer dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH1) y/o una región variable de cadena ligera (VL1), en las que la VH1 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39, y la VL1 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 40. En algunas modalidades específicas, el primer dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH1) y una región variable de cadena ligera (VL1), en las que la VH1 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39, y la VL1 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 40; los CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, IMGT, Chothia, AbM o Contact, por ejemplo, según el esquema de numeración de Kabat.

En algunas modalidades específicas, el primer dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH1) y una región variable de cadena ligera (VL1), en las que la VH1 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NOs: 41-43, respectivamente, y la VL1 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NOs: 44-46, respectivamente.

En algunas modalidades específicas, el primer dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH1) y una región variable de cadena ligera (VL1), en las que la VH1 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 41-43, respectivamente, y la VL1 comprende un

LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 44-46, respectivamente.

En algunas modalidades específicas, la secuencia de aminoácidos del primer dominio de unión al antígeno comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 41-46.

En algunas modalidades específicas, el VH1 y/o el VL1 se modifican mediante humanización, mutación inversa, maduración de afinidad, eliminación o reducción de epítopos de células T (TCE), reducción de la desamidación del anticuerpo y/o reducción de la isomerización del anticuerpo.

En algunas modalidades específicas, el VH1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la misma, y/o el VL1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 40 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la misma.

En algunas modalidades específicas, la secuencia de aminoácidos del VH1 se expone en SEQ ID NO: 39, y la secuencia de aminoácidos del VL1 se expone en SEQ ID NO: 40.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a GPC3/TRGV9 que comprende cualquiera de los primeros dominios de unión a antígenos mencionados anteriormente que se unen específicamente a GPC3 y un segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9, en la que el segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9 comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y/o un CDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29, por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29; o

2) una región variable de cadena pesada (VH2) y/o una región variable de cadena ligera (VL2), en la que la VH2 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-32, y la VL2 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35,

en el que los CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, IMGT, Chothia, AbM o Contact, por ejemplo, según el esquema de numeración de Kabat.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a GPC3/TRGV9 que comprende cualquiera de los primeros dominios de unión a antígenos mencionados anteriormente que se unen específicamente a GPC3 y un segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9, en la que el segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9 comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y/o un CDR3, en el que el CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 6, el CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 7, y el CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8; o

5 2) un VH2 y/o un VL2, en el que el VH2 comprende un HCDR1, un HCDR2 y/o un HCDR3, en el que el HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 11, el HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12, y el HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 13; el VL comprende un LCDR1, un LCDR2 y/o un LCDR3, en el que el LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos
10 establecida en SEQ ID NO: 14, el LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, y el LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a GPC3/TRGV9 que comprende cualquiera de los primeros dominios de unión a antígenos mencionados
15 anteriormente que se unen específicamente a GPC3 y un segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9, en la que el segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9 comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y un CDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 6-8,
20 respectivamente; y/o

2) un VH2 y un VL2, en el que el VH2 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 11-13, respectivamente, y el VL2 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 14-16, respectivamente.

25 En algunas modalidades, el dominio variable único de inmunoglobulina mencionado anteriormente, o VH o VL, se modifica mediante humanización, mutación inversa, maduración de afinidad, eliminación/reducción del epítipo de células T (TCE), reducción de la desamidación del anticuerpo y/o reducción de la isomerización del anticuerpo.

En algunas modalidades, las regiones del marcos de trabajo de la cadena pesada de una plantilla de la línea germinal humana utilizada para la humanización del dominio variable único de inmunoglobulina mencionado anteriormente se derivan de IGHV3-64; las regiones del marco de trabajo de la cadena pesada de una plantilla de la línea germinal humana utilizada para la ingeniería de humanización del VH se derivan de IGHV3-21, y las regiones del marco de trabajo de la cadena ligera de una plantilla de la línea germinal humana utilizada para la ingeniería de
35 humanización del VL se derivan de IGKV1-12.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a GPC3/TRGV9 que comprende cualquiera de los primeros dominios de unión a antígenos mencionados anteriormente que se unen específicamente a GPC3 y un segundo dominio de unión a antígenos

que se une específicamente a TRGV9, en la que el segundo dominio de unión a antígenos que se une específicamente a TRGV9 comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma; o

2) un VH2 y/o un VL2, en el que el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-32, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con ella, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con ella.

En algunas modalidades específicas, se selecciona una combinación de un VH2 y un VL2 del grupo que consiste en lo siguiente:

2-1) el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-2) el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-3) el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-4) el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende o es un anticuerpo anti-GPC3/TRGV9 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPC3/TRGV9 o el fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo recombinante o un fragmento del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPC3/TRGV9 es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo

multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo triespecífico). En algunas modalidades, un dominio variable único de inmunoglobulina en el anticuerpo anti-GPC3/TRGV9 o el fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo de dominio único o un VHH. En algunas modalidades específicas, el fragmento de unión al antígeno incluye, entre otros, un Fab, un Fv, un sFv, un Fab', un F(ab')₂, un anticuerpo lineal, un anticuerpo de cadena única, un scFv, un sdAb, un sdFv, un nanocuerpo, un pepticuerpo, un anticuerpo de dominio, un di-cuerpo, un tri-cuerpo, un tetra-cuerpo, un di-scFv en tándem y un tri-scFv en tándem.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) de los dominios variables únicos de inmunoglobulina mencionados anteriormente. En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) combinaciones de los VH1 y VL1 mencionados anteriormente. En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) combinaciones de los VH2 y VL2 mencionados anteriormente.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende además una región Fc de inmunoglobulina humana, por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende además una región Fc de inmunoglobulina humana; por ejemplo, la región Fc es una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana; por ejemplo, la región Fc se describe en SEQ ID NO: 51 o tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma. En algunas modalidades específicas, la región Fc puede ser una región Fc con una función efectora reducida; por ejemplo, la región Fc puede comprender una mutación, y las regiones Fc de IgG ejemplares con una función efectora reducida comprenden las siguientes sustituciones: N297A o N297Q (IgG1); L234A/L235A (IgG1); V234A/G237A (IgG2); L235A/G237A/E318A (IgG4); H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2); C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1); C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1); L234F/L235E/P331S (IgG1); L234F/L235E (IgG1); L234F o L235E (IgG1); o L234A o L235A (IgG1) o S267E/L328F (IgG1).

En algunas modalidades específicas, la región Fc comprende una primera subunidad (Fc1) y una segunda subunidad (Fc2). En algunas modalidades específicas, se introduce una mutación que hace que las dos subunidades (Fc1 y Fc2) de la región Fc se acoplen para formar un dímero, o una mutación que reduce la homodimerización. En algunas modalidades específicas, la primera subunidad y la segunda subunidad comprenden mutaciones de tipo «knob-into-hole». Por ejemplo, dentro de una interfaz CH3/CH3, uno, dos o más residuos de aminoácidos en un dominio CH3 de la Fc1 se mutan en uno o más residuos de aminoácidos con volúmenes de cadena lateral mayores, produciendo así protuberancias (o «knobs») en la superficie del dominio CH3 de la Fc1. En consecuencia, uno, dos o más residuos de aminoácidos

en un dominio CH3 del Fc2 que interactúan con el dominio CH3 del Fc1 se mutan en residuos de aminoácidos con volúmenes de cadena lateral más pequeños, produciendo así cavidades (o agujeros) en la superficie del dominio CH3 del Fc2. La primera subunidad (Fc1) y la segunda subunidad (Fc2) solo se utilizan para distinguir entre dos subunidades diferentes; por lo tanto, ambas son intercambiables.

En algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 354, 356, 358 y 366, y el Fc2 comprende una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 349, 356, 358, 366, 368 y 407. En algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende una mutación en la posición 366, y el Fc2 comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 366, 368 y 407 o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende una mutación en la posición 354 o 356, y el Fc2 comprende una mutación en la posición 349. En algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende una mutación en la posición 354 o 356, y el Fc2 comprende mutaciones en las posiciones 349, 366, 368 y 407.

En algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 354C, 356E, 358M y 366W, y el Fc2 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 349C, 356E, 358M, 366S, 368A y 407V. En algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende la mutación 366W, y el Fc2 comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en 366S, 368A y 407V o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende la mutación 354C o 356C, y el Fc2 comprende la mutación 349C. Alternativamente, en algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende las mutaciones 354C/366W, y el Fc2 comprende las mutaciones 349C/366S/368A/407V.

En algunas modalidades específicas, el Fc1 comprende la mutación T366W, y el Fc2 comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en T366S, L368A y Y407V o cualquier combinación de las mismas; el Fc1 comprende la mutación S354C o E356C, y el Fc2 comprende la mutación Y349C; o el Fc1 comprende las mutaciones S354C/T366W, y el Fc2 comprende las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V. En algunas modalidades específicas, la secuencia de aminoácidos de la Fc1 se expone en SEQ ID NO: 52, y la secuencia de aminoácidos de la Fc2 se expone en SEQ ID NO: 53.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende un emparejamiento erróneo reducido entre las cadenas ligeras y pesadas, logrado mediante la mutación de aminoácidos en la interfaz entre la cadena pesada CH1 y la cadena ligera CL en términos de tamaño y carga de los aminoácidos. A modo de ejemplo, Roche intercambió los dominios de CH1 y CL y creó la plataforma CrossMab (Schaefer et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(27), pp. 11187-11192 (2011)), MedImmune mutó la cadena pesada (F126C) y la cadena ligera (S121C)

para introducir un enlace disulfuro (Mazor et al., mAbs, 7(2), pp. 377-389 (2015)), Amgen realizó además una modificación electrostática de la región CH1-CL (Liu et al., Journal of Biological Chemistry, 290(12), pp. 7535-7562 (2015)), y Lilly (Lewis et al., Nature Biotechnology, 32(2), pp. 191-198 (2014)) y Genentech (Dillon et al., mAbs, 9(2), pp. 213-230 (2017)) introdujeron mutaciones tanto en los dominios variables como en los constantes». WuXi Biologics sustituyó una región constante de un anticuerpo por una región constante de un TCR, tal y como se describe en CN109535257A (que se incorpora aquí por referencia en su totalidad).

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende una cadena Obscurin-O (establecida en SEQ ID NO: 47) y una cadena Titin-T (establecida en SEQ ID NO: 48) para prevenir o reducir el emparejamiento erróneo entre diferentes VH y VL.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende un enlazador.

En algunas modalidades, el dominio variable único de la inmunoglobulina o el VH y el VL y la región Fc en la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente están unidos, ya sea directamente o mediante un enlazador. El enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos no funcional de 1-20 o más aminoácidos que carece de una estructura secundaria o de orden superior. Por ejemplo, el enlazador está representado por $(G_mS_n)_h$ o $(G_mQ_n)_h$ o $(GGNGT)_h$ o $(YGNGT)_h$ o $(EPKSS)_h$ o $(A_mS_n)_h$, donde m y n se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en números enteros de 1 a 8, y h se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en números enteros de 1 a 20. Por ejemplo, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en G_4S , GS , GAP , $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$, $(G_4S)_4$, $(G_4S)_5$, $ASGS$, A_3S , etc.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:

1) una primera cadena pesada, una segunda cadena pesada y una cadena ligera, en la que:

la primera cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [dominio variable único de inmunoglobulina]-[enlazador 1]-[Fc1],

la segunda cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH1]-[enlazador 2]-[CH1]-[enlazador 3]-[Fc2], y

la cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL1]-[enlazador 4]-[CL];

o

la primera cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [dominio variable único de inmunoglobulina]-[enlazador 1]-[Fc2],

la segunda cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH1]-[enlazador 2]-[CH1]-[enlazador 3]-[Fc1], y

la cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL1]-[enlazador 4]-[CL];

donde - representa un enlazador peptídico, y el enlazador 1, el enlazador 2, el enlazador 3 y el enlazador 4 pueden ser idénticos o diferentes, pueden estar presentes o ausentes de forma independiente, y pueden seleccionarse de forma independiente del grupo que consiste en los enlazadores mencionados anteriormente en la presente divulgación;

en algunas modalidades específicas, el enlazador 1 es AAAS, y el enlazador 2, el enlazador 3 y el enlazador 4 están ausentes;

2) una primera cadena pesada, una primera cadena ligera, una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera, en las que:

la primera cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH2]-[enlazador 1]-[cadena O de obscurina]-[enlazador 2]-[Fc1],

la primera cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL2]-[enlazador 3]-[cadena T de titina],

la segunda cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH1]-[enlazador 4]-[CH1]-[enlazador 5]-[Fc2], y

la segunda cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL1]-[enlazador 6]-[CL];

o

la primera cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH1]-[enlazador 1]-[cadena O de obscurina]-[enlazador 2]-[Fc1],

la primera cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL1]-[enlazador 3]-[cadena T de titina],

la segunda cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH2]-[enlazador 4]-[CH1]-[enlazador 5]-[Fc2], y

la segunda cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL2]-[enlazador 6]-[CL],

donde - representa un enlazador peptídico, y el enlazador 1, el enlazador 2, el enlazador 3, el enlazador 4, el enlazador 5 y el enlazador 6 pueden ser idénticos o diferentes, pueden estar presentes o ausentes de forma independiente, y pueden seleccionarse de forma independiente del grupo que consiste en los enlazadores mencionados anteriormente en la presente divulgación;

en algunas modalidades específicas, el enlazador 1 y el enlazador 3 son GGGGS, y el enlazador 2, el enlazador 4, el enlazador 5 y el enlazador 6 están ausentes;

3) una primera cadena pesada, una primera cadena ligera, una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera, en las que:

la primera cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH2]-[enlazador 1]-[cadena O de obscurina]-[enlazador 2]-[Fc1],

la primera cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL2]-[enlazador 3]-[cadena T de titina],

la segunda cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH1]-[enlazador 4]-[CH1]-[enlazador 5]-[VH1]-[enlazador 6]-[CH1]-[enlazador 7]-[Fc2], y

5 la segunda cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL1]-[enlazador 8]-[CL];

o

la primera cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH1]-[enlazador 1]-[cadena O de obscurina]-[enlazador 2]-[Fc1],

10 la primera cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL1]-[enlazador 3]-[cadena T de titina],

la segunda cadena pesada, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VH2]-[enlazador 4]-[CH1]-[enlazador 5]-[VH2]-[enlazador 6]-[CH1]-[enlazador 7]-[Fc2], y

15 la segunda cadena ligera, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, es [VL2]-[enlazador 8]-[CL];

20 donde - representa un enlace peptídico, y el enlazador 1, el enlazador 2, el enlazador 3, el enlazador 4, el enlazador 5, el enlazador 6, el enlazador 7 y el enlazador 8 pueden ser idénticos o diferentes, pueden estar presentes o ausentes de forma independiente, y pueden seleccionarse de forma independiente del grupo que consiste en los enlazadores mencionados anteriormente en la presente divulgación;

en algunas modalidades específicas, el enlazador 1 y el enlazador 3 son GGGGS, el enlazador 5 es GGGGSGGGGS, y el enlazador 2, el enlazador 4, el enlazador 6, el enlazador 7 y el enlazador 8 están ausentes;

25 en algunas modalidades específicas, la relación molar entre la primera cadena pesada, la primera cadena ligera, la segunda cadena pesada y la segunda cadena ligera es de 1:1:1:2.

En algunas modalidades específicas, las secuencias de aminoácidos de la cadena Obscurin-O y de la cadena Titin-T se describen en las SEQ ID NOs: 47 y 48, respectivamente. En algunas modalidades específicas, el CL es un Ck, y las secuencias de aminoácidos del CH1 y del Ck se describen en las SEQ ID NOs: 49 y 50, respectivamente. En algunas modalidades
30 específicas, las secuencias de aminoácidos de Fc1 y Fc2 se describen en las SEQ ID NOs: 52 y 53, respectivamente.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a GPC3/TRGV9 seleccionada del grupo que consiste en:

35 1) que comprende una primera cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 54 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una segunda cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 55 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y

una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 56 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2) que comprende una primera cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 57 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una primera cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 58 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una segunda cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 59 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y una segunda cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en SEQ ID NO: 56 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma; y

3) que comprende una primera cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 57 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una primera cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 58 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una segunda cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 60 o que presenta al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y una segunda cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en SEQ ID NO: 61 o que presenta al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión a GPC3/TRGV9 seleccionada del grupo que consiste en:

1) que comprende una combinación de polipéptidos cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 54-56; en algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 tiene una relación molar entre el polipéptido descrito en la SEQ ID NO: 54, el polipéptido descrito en la SEQ ID NO: 55 y el polipéptido descrito en la SEQ ID NO: 56 de 1:1:1;

2) que comprende una combinación de polipéptidos cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 56-59; en algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 tiene una relación molar entre el polipéptido descrito en la SEQ ID NO: 56, el polipéptido descrito en la SEQ ID NO: 57, el polipéptido descrito en la SEQ ID NO: 58 y el polipéptido descrito en la SEQ ID NO: 59 de 1:1:1:1; y

3) que comprende una combinación de polipéptidos cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 57, 58, 60 y 61; en algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 tiene una relación molar del polipéptido descrito en SEQ ID NO: 57 con respecto al polipéptido descrito en SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 y el polipéptido descrito en SEQ ID NO: 61 de 1:1:1:2.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente es: una proteína que se une específicamente a GPC3 y al TCR $\gamma\delta$, o un anticuerpo anti-GPC3/TCR $\gamma\delta$ o un fragmento de unión al antígeno del mismo; una proteína que se une específicamente a GPC3 y a la cadena $\gamma 9$ del TCR, o un anticuerpo anti-GPC3/cadena $\gamma 9$ del

TCR o un fragmento de unión al antígeno del mismo; una proteína que se une específicamente a GPC3 y a la región variable de la cadena $\gamma 9$ del TCR ($V\gamma 9$), o un anticuerpo anti-GPC3/ $V\gamma 9$ TCR o un fragmento de unión al antígeno del mismo; una proteína que se une específicamente a GPC3 y al TCR $\gamma 9\delta 2$, o un anticuerpo anti-GPC3/TCR $\gamma 9\delta 2$ o un fragmento de unión al antígeno del mismo; una proteína que se une específicamente a GPC3 y al TCR $\gamma 9\delta 1$, o un anticuerpo anti-GPC3/TCR $\gamma 9\delta 1$ o un fragmento de unión al antígeno del mismo; una proteína que se une específicamente a GPC3 y a TRGV9, o un anticuerpo anti-GPC3/TRGV9 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente tiene al menos una función o propiedad seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:

(a) unión a las células T $\gamma 9\delta 2$ con una EC_{50} de ≤ 10 nM, por ejemplo, ≤ 5 nM, ≤ 4 nM, ≤ 3 nM, ≤ 2 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.5 nM, ≤ 0.2 nM o ≤ 0.1 nM, en el que el EC_{50} se determina mediante FACS, que es un método común de determinación de afinidad en la técnica, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo 5 de la presente divulgación;

(b) unión específica a la cadena $\gamma 9$ del TCR, por ejemplo, unión específica al TCR $\gamma 9\delta 1$ o unión específica al TCR $\gamma 9\delta 2$;

(c) ausencia de unión a una cadena $\gamma 8$ del TCR, por ejemplo, ausencia de unión a un TCR $\gamma 8\delta 2$;

(d) unión específica a la región variable de la cadena $\gamma 9$ del TCR (TRGV9);

(e) unión específica a un TCR quimérico $V\gamma\delta C\alpha\beta$ y ausencia de unión a un TCR quimérico $V\alpha\beta C\gamma\delta$;

en el que (b)-(e) pueden determinarse mediante un método de detección convencional en la técnica, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo 4 de la presente divulgación;

(f) unión específica a una proteína GPC3 o a células GPC3-positivas, y ninguna o escasa unión a células GPC3-negativas (por ejemplo, PBMC), por ejemplo, utilizando el método de detección del ejemplo 8 de la presente divulgación;

(g) unión a las proteínas GPC3 y $\gamma 9\delta 2$ del mono cinomolgo;

(h) ausencia de bloqueo de las señales naturales de BTN2A/BTN3A-TCR, por ejemplo, utilizando el método de detección del ejemplo 9 de la presente divulgación;

(i) mediación de la destrucción de células tumorales GPC3-positivas por parte de células T $\gamma\delta$ o mediación de la destrucción de células tumorales GPC3-positivas por parte de células T $\gamma\delta$ de forma dependiente del nivel de expresión de GPC3, por ejemplo, utilizando el método de detección del ejemplo 10 de la presente divulgación; mediación de la destrucción de células tumorales GPC3-positivas por parte de células T $\gamma\delta$ de una manera dependiente de la relación efector-objetivo, por ejemplo, utilizando el método de detección del ejemplo 12 de la presente divulgación; y mediación de la destrucción de células tumorales GPC3-positivas por parte de células T $\gamma\delta$ de una manera con baja variabilidad individual, por ejemplo, utilizando el método de detección del ejemplo 11 de la presente divulgación;

(j) inducción de una menor liberación de citocinas (por ejemplo, IFN γ y TNF α) durante la destrucción de células tumorales GPC3-positivas por parte de las células T $\gamma\delta$, por ejemplo, utilizando el método de detección del ejemplo 13 de la presente divulgación;

5 (k) la promoción de la proliferación de células T $\gamma\delta$ en PBMC, por ejemplo, utilizando el método de detección del ejemplo 14 de la presente divulgación; y

(l) inhibición *in vivo* de la proliferación de células tumorales GPC3-positivas, y/o inhibición del crecimiento de tumores GPC3-positivos, y/o eliminación de tumores GPC3-positivos, en la que se utiliza un modelo de ratón *in vivo* como método de detección del ejemplo 15 de la presente divulgación.

10 En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente puede unirse a TRGV9 con un valor K_D de $\leq 1 \times 10^{-7}$ M, por ejemplo, $\leq 1 \times 10^{-8}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-9}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-10}$ M.

En algunas modalidades, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente puede unirse a GPC3 con un valor K_D de $\leq 1 \times 10^{-7}$ M, por ejemplo, $\leq 1 \times 10^{-8}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-9}$ M, o
15 $\leq 1 \times 10^{-10}$ M.

En algunas modalidades, el dominio variable único de inmunoglobulina en la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprende una variante, en la que la variante comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29. En algunas modalidades, el VH1 y/o el VL1 de la proteína de unión a
20 GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprenden una variante, en la que la variante del VH1 comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 39, y la variante del VL comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 40. En algunas modalidades, el VH2 y/o el VL2 de la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente comprenden una variante, en la que la variante del
25 VH2 comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-32, y la variante de la VL comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35. «Más» es, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Las mutaciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras, sustituciones o modificaciones, y/o deleciones o adiciones que no afecten a la función; las
30 mutaciones de aminoácidos pueden producirse en los CDR y/o en los FR.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína que se une o compite por la unión a los mismos epítopos de TRGV9 y/o GPC3 con la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína cuya unión a TRGV9 y/o GPC3 es
35 bloqueada por la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona una proteína o molécula que comprende cualquiera de las proteínas de unión a GPC3/TRGV9 mencionadas anteriormente de la presente

divulgación. La proteína o molécula puede ser un conjugado o una proteína de fusión formada con otros compuestos u otros polipéptidos. Por ejemplo, el conjugado puede comprender cualquier marcador detectable.

Polinucleótido y vector

5 La presente divulgación proporciona un polinucleótido que codifica la proteína de unión a TRGV9 o la proteína de unión a GPC3/TRGV9 de la presente divulgación. El ácido nucleico de la presente divulgación puede ser un ARN, ADN o ADNc. Según algunas modalidades de la presente divulgación, el ácido nucleico de la presente divulgación es un ácido nucleico sustancialmente aislado.

10 El ácido nucleico de la presente divulgación también puede adoptar la forma de un vector y puede estar presente en el vector y/o formar parte del vector. El vector es, por ejemplo, un plásmido, un cósmido, un YAC o un vector viral. El vector puede ser, en particular, un vector de expresión, es decir, un vector que puede proporcionar la expresión de la proteína de unión a TRGV9 o de la proteína de unión a GPC3/TRGV9 *in vitro* y/o *in vivo* (es decir, en una célula huésped, un organismo huésped y/o un sistema de expresión adecuados). El vector de expresión comprende generalmente al menos uno de los ácidos nucleicos de la presente divulgación, que está unido de manera operativa a uno o más elementos reguladores de la expresión adecuados (por ejemplo, promotores, potenciadores y terminadores). La selección de los elementos y sus secuencias para la expresión en un huésped concreto es de conocimiento común entre los expertos en la materia. Los elementos reguladores y otros elementos útiles o necesarios para la expresión de la proteína de unión a TRGV9 y la proteína de unión a GPC3/TRGV9 de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, promotores, potenciadores, terminadores, factores de integración, marcadores de selección, secuencias líderes y genes reporteros.

25 El ácido nucleico de la presente divulgación puede prepararse u obtenerse por medios conocidos (por ejemplo, mediante síntesis automática de ADN y/o técnicas de ADN recombinante) basándose en la información sobre las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la presente divulgación, y/o puede aislarse de una fuente natural adecuada.

En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a TRGV9, en la que la proteína de unión a TRGV9 comprende:

30 1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y/o un CDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29, por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29; y/o

35 2) una región variable de cadena pesada (VH) y/o una región variable de cadena ligera (VL), en la que la VH comprende un HCDR1, un HCDR2 y/o un HCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-32, y la VL comprende un LCDR1, un LCDR2 y/o un LCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35,

en el que los CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, IMGT, Chothia, AbM o Contact, por ejemplo, según el esquema de numeración de Kabat.

En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a TRGV9, en la que dicha proteína de unión a TRGV9 comprende:

5 1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y un CDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 6-8, respectivamente; y/o

 2) un VH y un VL, en los que el VH comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 11-13, respectivamente, y el VL
10 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 14-16, respectivamente.

En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a TRGV9, en la que la proteína de unión a TRGV9 comprende: 1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en
15 cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma; y/o

 2) un VH y/o un VL, en el que el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-33, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con ella, y el VL comprende la secuencia de
20 aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con ella.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a TRGV9, en la que la proteína de unión a TRGV9 comprende los siguientes VH y VL:

25 2-1) el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

30 2-2) el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

35 2-3) el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ

ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-4) el VH comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a TRGV9, en la que la proteína de unión a TRGV9 comprende:

1) la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 36 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma; y

2) una cadena pesada y una cadena ligera, en las que la cadena pesada se describe en SEQ ID NO: 37 o tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma, y la cadena ligera se describe en SEQ ID NO: 38 o tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma.

En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que la proteína de unión a GPC3/TRGV9 comprende un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a GPC3 y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a TRGV9.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que el primer dominio de unión al antígeno mencionado anteriormente comprende una región variable de la cadena pesada (VH1) y/o una región variable de la cadena ligera (VL1), en la que la VH1 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39, y la VL1 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 40.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que el primer dominio de unión al antígeno mencionado anteriormente comprende una región variable de cadena pesada (VH1) y una región variable de cadena ligera (VL1), en la que la VH1 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se establecen en las SEQ ID NOs: 41-43, respectivamente, y la VL1 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 44-46, respectivamente.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que el primer dominio de unión al antígeno mencionado anteriormente comprende una región variable de cadena pesada (VH1) y una región variable de cadena ligera (VL1), en la que la VH1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90

% de identidad de secuencia con la misma, y/o la VL1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 40 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que el mencionado segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a TRGV9 comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y/o un CDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29, por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29; o

2) una región variable de cadena pesada (VH2) y/o una región variable de cadena ligera (VL2), en la que la VH2 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-32, y la VL2 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que el mencionado segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a TRGV9 comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un CDR1, un CDR2 y un CDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 6-8, respectivamente; y/o

2) un VH2 y un VL2, en los que el VH2 comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 11-13, respectivamente, y el VL2 comprende un LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se describen en las SEQ ID NOs: 14-16, respectivamente.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que el mencionado segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a TRGV9 comprende:

1) un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 5 y 26-29 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma; o

2) un VH2 y/o un VL2, en el que el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 y 30-32, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con ella, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 y 33-35, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con ella.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que el mencionado segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a TRGV9 comprende los siguientes VH2 y VL2:

2-1) el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-2) el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-3) el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2-4) el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 33-35 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma.

En algunas modalidades específicas, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de unión a GPC3/TRGV9, en la que la proteína de unión a GPC3/TRGV9 se selecciona del grupo que consiste en:

1) que comprende una primera cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 54 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una segunda cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 55 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 56 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma;

2) que comprende una primera cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 57 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una primera cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 58 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una segunda cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 59 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y una segunda cadena

ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en SEQ ID NO: 56 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma; y

3) que comprende una primera cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 57 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una primera cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 58 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, una segunda cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 60 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma, y una segunda cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se describe en SEQ ID NO: 61 o que tiene al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad con la misma.

Célula huésped

La presente divulgación proporciona una célula huésped recombinante que expresa o es capaz de expresar una o más de las proteínas de unión a TRGV9 y las proteínas de unión a GPC3/TRGV9 de la presente divulgación y/o que comprende el polinucleótido o el vector de la presente divulgación. En algunas modalidades, la célula huésped es una célula bacteriana, una célula fúngica o una célula de mamífero.

Las células bacterianas incluyen, por ejemplo, células de cepas bacterianas gramnegativas (p. ej., cepas de *Escherichia coli*, cepas de *Proteus* y cepas de *Pseudomonas*) y cepas bacterianas grampositivas (p. ej., cepas de *Bacillus*, cepas de *Streptomyces*, cepas de *Staphylococcus* y cepas de *Lactococcus*).

Las células fúngicas incluyen, por ejemplo, células de las especies *Trichoderma*, *Neurospora* y *Aspergillus*; o células de las especies *Saccharomyces* (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*) y *Hansenula*.

Las células de mamíferos incluyen, por ejemplo, células HEK293, células CHO, células BHK, células HeLa y células COS.

Sin embargo, en la presente divulgación también pueden utilizarse células de anfibios, células de insectos, células vegetales y cualquier otra célula utilizada en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas.

Método de preparación

La presente divulgación proporciona un método para preparar una proteína de unión a TRGV9 o una proteína de unión a GPC3/TRGV9, que comprende expresar la proteína diana en la célula huésped mencionada anteriormente y aislar la proteína diana de la célula huésped. Opcionalmente, el método puede comprender además una etapa de purificación, por ejemplo, purificando mediante una columna de A o G Sepharose FF que contenga un tampón ajustado para eliminar por lavado los componentes unidos de forma no específica, y a continuación eluyendo el anticuerpo unido mediante un método de gradiente de pH, detectando mediante SDS-PAGE y recogiendo. Opcionalmente, la filtración y la concentración se realizan mediante

métodos convencionales. Las mezclas solubles y los multímeros también pueden eliminarse mediante métodos convencionales, tales como tamices moleculares e intercambio iónico. Los productos resultantes deben congelarse inmediatamente, por ejemplo a -70 °C, o liofilizarse.

Los métodos para producir y purificar anticuerpos son bien conocidos en el estado de la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (capítulos 5-8 y 15).

Los anticuerpos modificados o los fragmentos de unión a antígenos de la presente divulgación pueden prepararse y purificarse mediante métodos convencionales. Por ejemplo, las secuencias de ADNc que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden clonarse y recombinarse en un vector de expresión. Las células CHO pueden transfectarse de forma estable con vectores de expresión de inmunoglobulina recombinante. Los sistemas de expresión de mamíferos pueden dar lugar a la glicosilación de los anticuerpos, particularmente en el extremo N-terminal altamente conservado de la región Fc. Se obtienen clones estables mediante la expresión de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos humanos. Los clones positivos se expanden en un medio de cultivo sin suero en un biorreactor para producir anticuerpos. La solución de cultivo con los anticuerpos secretados puede purificarse y recogerse mediante técnicas convencionales. Los anticuerpos pueden filtrarse y concentrarse mediante métodos convencionales. Las mezclas solubles y los multímeros también pueden eliminarse mediante métodos convencionales, tales como tamices moleculares e intercambio iónico.

20 Composición

La presente divulgación proporciona una composición que comprende la proteína de unión a TRGV9 y/o la proteína de unión a GPC3/TRGV9 de la presente divulgación mencionadas anteriormente. Por ejemplo, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de la proteína de unión a TRGV9 y/o la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionadas anteriormente que sea eficaz para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad, y al menos un excipiente, diluyente o material auxiliar farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades específicas, una dosis unitaria de la composición farmacéutica puede comprender entre un 0.01 % y un 99 % en peso de la proteína de unión a TRGV9 y/o la proteína de unión a GPC3/TRGV9, o bien una dosis unitaria de la composición farmacéutica comprende entre 0.1 y 2000 mg de la proteína de unión a TRGV9 y/o la proteína de unión a GPC3/TRGV9. En algunas modalidades específicas, la dosis unitaria comprende de 1 a 1000 mg.

En algunas modalidades, se proporciona un producto (por ejemplo, un kit) que comprende la proteína de unión a TRGV9 y/o la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionadas anteriormente. Opcionalmente, el producto comprende un envase y una etiqueta. El envase es, por ejemplo, un frasco, una jeringa y un tubo de ensayo. El envase contiene una composición farmacéutica eficaz para tratar un trastorno. La etiqueta situada en el envase o asociada a él indica que la composición farmacéutica se utiliza para tratar el trastorno en cuestión.

En algunas modalidades, la enfermedad mencionada anteriormente es una enfermedad de proliferación celular o un cáncer.

Método de tratamiento y uso farmacéutico

La presente divulgación proporciona un método para tratar, aliviar, prevenir o diagnosticar una enfermedad o trastorno mediante el uso de la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente, la proteína de unión a GPC3/TRGV9, el polinucleótido codificador de la misma o una composición de la misma (incluida la composición farmacéutica).

En algunas modalidades, se proporciona un método para mejorar, aliviar, tratar o prevenir una enfermedad, que comprende administrar a un sujeto una cantidad de lo siguiente que sea eficaz para mejorar, aliviar, tratar o prevenir la enfermedad:

1) la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente, el polinucleótido codificador de la misma o una composición farmacéutica de la misma de la presente divulgación; o

2) la proteína de unión a GPC3/TRGV9 mencionada anteriormente, el polinucleótido codificador de la misma o una composición farmacéutica de la misma de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de los elementos 1) a 2) mencionados anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado a mejorar, aliviar, tratar o prevenir una enfermedad.

En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediante el uso de la proteína de unión a TRGV9 de la presente divulgación en combinación con células T $\gamma\delta$. En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediante el uso de la proteína de unión a GPC3/TRGV9 de la presente divulgación en combinación con células T $\gamma\delta$. En algunas modalidades, las células T $\gamma\delta$ son autólogas o alogénicas.

En algunas modalidades, se utiliza cualquiera de las proteínas de unión a TRGV9 de la presente divulgación mencionadas anteriormente para tratar una enfermedad, incluido el uso en combinación con células T $\gamma\delta$. En algunas modalidades, las células T $\gamma\delta$ se utilizan para tratar una enfermedad, incluido el uso en combinación con cualquiera de las proteínas de unión a TRGV9 de la presente divulgación mencionadas anteriormente.

En algunas modalidades, cualquiera de las proteínas de unión a GPC3/TRGV9 mencionadas anteriormente de la presente divulgación se utiliza para tratar una enfermedad, incluido el uso en combinación con células T $\gamma\delta$. En algunas modalidades, las células T $\gamma\delta$ se utilizan para tratar una enfermedad, incluido el uso en combinación con cualquiera de las proteínas de unión a GPC3/TRGV9 mencionadas anteriormente de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar una enfermedad, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las proteínas de unión a TRGV9 mencionadas anteriormente de la presente divulgación y células T $\gamma\delta$. En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar una enfermedad, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad

terapéuticamente eficaz de cualquiera de las proteínas de unión a GPC3/TRGV9 mencionadas anteriormente de la presente divulgación y células T $\gamma\delta$.

En algunas modalidades, la enfermedad mencionada anteriormente es una enfermedad o trastorno causado por la sobreexpresión de GPC3.

5 En algunas modalidades, la enfermedad mencionada es una enfermedad proliferativa celular o un cáncer.

En algunas modalidades específicas, la enfermedad mencionada anteriormente es un cáncer GPC3-positivo.

En algunas modalidades, la enfermedad mencionada anteriormente es cáncer de hígado.

10 En algunas modalidades específicas, la enfermedad mencionada es un cáncer de hígado GPC3-positivo.

Detección

La presente divulgación proporciona el uso de la proteína de unión a TRGV9, la proteína de unión a GPC3/TRGV9, el polinucleótido codificador de la misma o la composición para la
15 detección. La presente divulgación proporciona además un método, sistema o dispositivo para detectar GPC3 o TRGV9 *in vivo* o *in vitro*, que comprende tratar una muestra con la proteína de unión, el polinucleótido o la composición mencionados anteriormente de la presente divulgación.

En algunas modalidades, se proporciona además un kit que comprende la proteína de unión a TRGV9 mencionada anteriormente, la proteína de unión a GPC3/TRGV9, el
20 polinucleótido codificante de la misma o una composición de la misma, en el que el kit puede comprender además instrucciones para su uso diagnóstico. El kit puede comprender además al menos un reactivo adicional, como un marcador o un agente de diagnóstico adicional. Para uso *in vivo*, la proteína de unión a TRGV9, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 y el polinucleótido codificante de las mismas pueden formularse como composiciones farmacéuticas.

25

Breve Descripción de las Figuras

La FIG. 1 muestra diagramas esquemáticos de las estructuras de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR.

30 Las FIGS. 2A a 2D muestran la actividad de unión por FACS de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR a células GPC3-positivas y a células T $\gamma\delta$ humanas, en las que la FIG. 2A muestra la unión de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR en células HepG2, la FIG. 2B muestra la unión de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR a células DLD-1, la FIG. 2C muestra la unión de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR a células
35 T $\gamma\delta$ humanas, y la FIG. 2D muestra la unión de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR a PBMC.

Las FIGS. 3A a 3B muestran los efectos de los anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR sobre las señales naturales BTN2A/BTN3A-TCR. La FIG. 3A muestra el efecto de SDP01378 sobre las señales

naturales de BTN2A/BTN3A-TCR, y la FIG. 3B muestra el efecto de SDP01315 sobre las señales naturales de BTN2A/BTN3A-TCR.

Las FIGS. 4A a 4D muestran la actividad citotóxica de los anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR contra células tumorales con diferentes niveles de expresión de GPC3, donde la FIG. 4A muestra la actividad citotóxica contra células HepG2, la FIG. 4B muestra la actividad citotóxica contra células Huh-7, la FIG. 4C muestra la actividad citotóxica contra células MKN-45 y la FIG. 4D muestra la actividad citotóxica contra células DLD-1.

Las FIGS. 5A a 5D muestran la actividad citotóxica de las células T $\gamma\delta$ derivadas de diferentes donantes contra HepG2, en las que las células T $\gamma\delta$ utilizadas en las FIGS. 5A-5D se derivaron de la expansión inducida de los donantes #SC12004, #SC12392, #XC11053 y #XC11061, respectivamente.

Las FIGS. 6A a 6C muestran la destrucción de células tumorales con baja expresión de antígeno por anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR en diferentes relaciones efector-objetivo, en las que la relación efector-objetivo en la FIG. 6A es de 1:1, la relación efector-blanco en la FIG. 6B es de 10:1, y la relación efector-blanco en la FIG. 6C es de 30:1.

Las FIGS. 7A a 7D muestran la actividad de destrucción tras un aumento de la proporción de células T $\gamma\delta$ en las PBMC. La FIG. 7A muestra la destrucción por parte de las PBMC del donante #XC11053, y la FIG. 7B muestra la actividad de destrucción tras la adición de un 30 % de células T $\gamma\delta$ a las PBMC del donante # XC11053. La FIG. 7C muestra la actividad citotóxica de las PBMC del donante # SC12392, y la FIG. 7D muestra la actividad citotóxica tras la adición de un 30 % de células T $\gamma\delta$ a las PBMC del donante # SC12392.

Las FIGS. 8A a 8D muestran la liberación de citocinas, donde las FIGS. 8A-8B muestran la liberación de IFN γ y TNF α , respectivamente, durante la lisis por el donante # XC11053, y las FIGS. 8C-8D muestran la liberación de IFN γ y TNF α , respectivamente, durante la lisis por el donante # SC12392.

La FIG. 9 muestra la promoción de la proliferación de células T $\gamma\delta$ en PBMC por anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR.

Las FIGS. 10A a 10B muestran la actividad antitumoral de SDP01716 en un modelo de tumor de xenoinjerto Huh-7, en el que la FIG. 10A muestra los cambios en el volumen tumoral del ratón, y la FIG. 10B muestra los cambios en el peso corporal del ratón.

Las FIGS. 11A a 11B muestran la actividad antitumoral de diferentes anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR en un modelo de tumor de xenoinjerto Huh-7, en el que la FIG. 11A muestra los cambios en el volumen tumoral del ratón, y la FIG. 11B muestra los cambios en el peso corporal del ratón.

Descripción Detallada de la Invención

Definiciones

Con el fin de facilitar la comprensión de la presente divulgación, a continuación se definen específicamente ciertos términos técnicos y científicos. A menos que se defina específicamente lo contrario en el presente documento, todos los demás términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los significados generalmente entendidos por los expertos en la materia a la que pertenece la presente divulgación.

Los códigos de tres letras y de una sola letra para los aminoácidos utilizados en la presente divulgación son los descritos en J. Biol. Chem., 243, p. 3558 (1968).

«TRGV9» se refiere a un polipéptido capaz de formar un receptor de células T cuando se expresa en la superficie de una célula T $\gamma\delta$. Las células T $\gamma\delta$ que expresan TRGV9 se encuentran entre las primeras células T en desarrollarse en el feto humano y representan un subconjunto importante de las células T $\gamma\delta$ en las células de la sangre periférica de adultos sanos. «TRGV9» incluye cualquier variante, isotipo y homólogo de especie de TRGV9 que sea expresado de forma natural por las células, incluidas las células T, o que sea capaz de expresarse en células transfectadas con un gen o ADNc que codifique el polipéptido. En una modalidad específica, TRGV9 es TRGV9 humano. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de TRGV9 humano se proporciona en el número de acceso del GenBank NG_001336.2.

«GPC3» se refiere al glipicano 3, que está anclado a la membrana celular mediante fosfatidilinositol y es un marcador del carcinoma hepatocelular. Una secuencia de aminoácidos de GPC3 humano ejemplar se proporciona en el número de acceso de Uniprot P51654.

La «proteína de unión a TRGV9» abarca cualquier proteína capaz de unirse específicamente a TRGV9 o cualquier molécula que comprenda dicha proteína, incluyendo, entre otros, anticuerpos dirigidos contra TRGV9 tal y como se definen en la presente divulgación, así como fragmentos de unión al antígeno de los mismos o proteínas de fusión de los mismos. En algunas modalidades, la «proteína de unión a TRGV9» puede comprender al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) anticuerpo de dominio único o VHH que se une específicamente a TRGV9 en los ejemplos de la presente divulgación. En algunas modalidades, la «proteína de unión a TRGV9» puede comprender al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) combinación de VH y VL que se une específicamente a TRGV9 en los ejemplos de la presente divulgación. En algunas modalidades, la «proteína de unión a TRGV9» de la presente divulgación puede comprender, además de un dominio variable único de inmunoglobulina o una combinación de VH y VL de TRGV9, un enlazador y/o un grupo con una función efectora, como un grupo que prolonga la vida media (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina que se une a la albúmina sérica) y/o un socio de fusión (por ejemplo, albúmina sérica) y/o un polímero conjugado (por ejemplo, PEG) y/o una región Fc. En algunas modalidades, la «proteína de unión a TRGV9» abarca los anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR o fragmentos de unión a antígenos de los mismos en los ejemplos de la presente divulgación.

La «proteína de unión a GPC3/TRGV9» abarca cualquier proteína capaz de unirse específicamente a GPC3 y TRGV9 o cualquier molécula que comprenda dicha proteína,

incluyendo, entre otros, anticuerpos, polipéptidos, proteínas de fusión de anticuerpos y polipéptidos, o conjugados de los mismos. En algunas modalidades, la «proteína de unión a GPC3/TRGV9» abarca los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR en los ejemplos de la presente divulgación.

5 «Anticuerpo» abarca una variedad de estructuras de anticuerpos, incluyendo, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos (o fragmentos de unión a antígenos, o grupos de unión a antígenos), siempre que exhiban la actividad de unión a antígenos deseada. Un anticuerpo puede referirse
 10 a una inmunoglobulina, que es una estructura de cuatro cadenas peptídicas formada por la unión de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras mediante enlaces disulfuro entre cadenas. Las regiones constantes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas difieren en su composición y disposición de aminoácidos; por lo tanto, también difieren en su antigenicidad. En consecuencia, las inmunoglobulinas pueden dividirse en cinco clases, o isotipos de inmunoglobulinas, a saber,
 15 IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, y sus correspondientes cadenas pesadas son las cadenas μ , δ , γ , α y ϵ , respectivamente. Las Ig de la misma clase pueden dividirse en diferentes subclases en función de la composición de aminoácidos de sus regiones bisagra y del número y las posiciones de los enlaces disulfuro de la cadena pesada; por ejemplo, las IgG pueden dividirse en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las cadenas ligeras se dividen en cadenas κ o λ en función de sus regiones
 20 constantes. Cada una de las cinco clases de Ig puede tener una cadena κ o una cadena λ . En las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos, las secuencias de unos 110 aminoácidos cerca del extremo N-terminal varían considerablemente y, por lo tanto, se denominan regiones variables (regiones V); las secuencias de aminoácidos restantes cerca del extremo C-terminal son relativamente estables y, por lo tanto, se denominan regiones constantes (regiones C). La
 25 región variable comprende 3 regiones hipervariables (HVR) y 4 regiones de estructura (FR) con secuencias relativamente conservadoras. Las 3 regiones hipervariables determinan la especificidad del anticuerpo y, por lo tanto, también se conocen como regiones determinantes de complementariedad (CDR). Cada región variable de la cadena ligera (VL) o de la cadena pesada (VH) consta de 3 CDR y 4 FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo
 30 en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las 3 CDR de la cadena ligera se denominan LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y las 3 CDR de la cadena pesada se denominan HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser policlonales, monoclonales, xenogénicos, alogénicos, singénicos o formas modificadas de los mismos, siendo los anticuerpos
 35 monoclonales especialmente aplicables en diversos ejemplos. En general, los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos recombinantes. Tal y como se utiliza en el presente documento, «recombinante» se refiere generalmente a productos tales como una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector, e indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector

han sido modificados mediante la introducción de un ácido nucleico o una proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o una proteína natural, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. Por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma celular nativa (no recombinante) o expresan genes nativos que originalmente se expresan de forma anómala, se expresan a niveles bajos o no se expresan en absoluto.

Para la determinación o definición de los CDR, la representación determinista de los CDR y la identificación de los residuos que componen los sitios de unión de un anticuerpo pueden lograrse resolviendo la estructura del anticuerpo y/o resolviendo la estructura del complejo anticuerpo-ligando. Esto puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, como la cristalografía de rayos X. Se pueden utilizar diversos métodos de análisis para identificar los CDR, incluyendo, entre otros, el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, el esquema de numeración de AbM, el esquema de numeración de IMGT, la definición de contacto y la definición conformacional. El esquema de numeración de Kabat es un estándar para numerar residuos en anticuerpos y se utiliza generalmente para identificar CDR (véase, p. ej., Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28:214-8). El esquema de numeración de Chothia es similar al esquema de numeración de Kabat, salvo que tiene en cuenta la ubicación de determinadas regiones de bucles estructurales (véase, p. ej., Chothia et al., 1986, *J. Mol. Biol.*, 196:901-17; Chothia et al., 1989, *Nature*, 342:877-83). El esquema de numeración AbM adopta un paquete de integración de programas informáticos para modelar estructuras de anticuerpos fabricado por Oxford Molecular Group (véase, p. ej., Martin et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272; «AbMTM, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies», Oxford, Reino Unido; Oxford Molecular, Ltd.). El esquema de numeración AbM adopta una combinación de una base de datos de conocimientos y el método de novo para modelar la estructura terciaria de los anticuerpos a partir de secuencias básicas (véanse las descritas en Samudrala et al., 1999, «Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach», *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198). La definición de contacto se basa en el análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles (véase, p. ej., MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 5:732-45). En la definición conformacional, las posiciones de los CDR pueden identificarse como residuos que aportan entalpía a la unión al antígeno (véase, p. ej., Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166). Además, otras definiciones de los límites de los CDR pueden no seguir estrictamente uno de los métodos descritos anteriormente, pero aún así solaparse con al menos una parte de los CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse basándose en predicciones o resultados experimentales de que un residuo concreto o un grupo concreto de residuos no afecta significativamente a la unión al antígeno. Tal y como se utiliza en la presente divulgación, un CDR puede referirse a un CDR definido por cualquier método

conocido en la técnica, incluidas combinaciones de métodos. La correspondencia entre los diversos esquemas de numeración es bien conocida por los expertos en la materia.

Un experto en la materia entiende que, aunque se emplee un esquema de numeración concreto (como el de Kabat) en un ejemplo específico o en una SEQ ID NO específica, el experto puede determinar las secuencias a las que corresponde la secuencia según otros esquemas de numeración, y dichas secuencias se siguen considerando comprendidas en el ámbito de la presente divulgación.

Un «dominio» de un polipéptido o proteína se refiere a una estructura proteica plegada que es capaz de mantener su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En general, un dominio es responsable de una única propiedad funcional de una proteína y, en muchos casos, puede añadirse, eliminarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de funciones del resto de la proteína y/o del dominio de la proteína.

El «dominio de inmunoglobulina» se refiere a una región globular de una cadena de anticuerpo (por ejemplo, una cadena de un anticuerpo convencional con una estructura de cuatro cadenas peptídicas o de un anticuerpo de cadena pesada) o a un polipéptido que consiste esencialmente en tales regiones globulares. Los dominios de inmunoglobulina se caracterizan por mantener la característica de plegamiento de la inmunoglobulina de la molécula de anticuerpo.

El «dominio variable de inmunoglobulina» consiste sustancialmente en cuatro «regiones de marco de trabajo» a las que se hace referencia en la técnica y en lo sucesivo como «región de marco de trabajo 1» o «FR1», «región de marco de trabajo 2» o «FR2», «región de marco de trabajo 3» o «FR3», y «región de marco de trabajo 4» o «FR4», y tres «regiones determinantes de complementariedad» o «CDR» a las que se hace referencia en la técnica y que en lo sucesivo se denominarán «región determinante de la complementariedad 1» o «CDR1», «región determinante de la complementariedad 2» o «CDR2», y «región determinante de la complementariedad 3» o «CDR3». La estructura o secuencia general de los dominios variables de la inmunoglobulina puede expresarse como: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Un dominio variable de la inmunoglobulina posee especificidad para un antígeno por el hecho de tener un sitio de unión al antígeno.

El «marco del anticuerpo (FR)» se refiere a una porción de un dominio variable que se utiliza como andamio para los bucles de unión al antígeno (CDR).

El término «dominio variable único de inmunoglobulina» se utiliza generalmente para referirse a un dominio variable de inmunoglobulina (que puede ser un dominio de cadena pesada o ligera, incluyendo un dominio VH, VHH o VL) que puede formar un sitio funcional de unión al antígeno sin interactuar con otros dominios variables (por ejemplo, sin interacciones VH/VL como las que se requieren entre los dominios VH y VL de los anticuerpos monoclonales convencionales de cuatro cadenas). Entre los ejemplos de «dominio variable único de inmunoglobulina» se incluyen los nanocuerpos (incluidos los VHH, los VHH humanizados y/o los VH camelizados, p.

ej., los VH humanos camelizados), los IgNAR, los dominios, los anticuerpos (de dominio único) como dominios VH o derivados de dominios VH (como los dAbs®) y anticuerpos (de dominio único) como dominios VL o derivados de dominios VL (como dAbs®). Por lo general, se prefieren los dominios variables únicos de inmunoglobulina basados en y/o derivados de dominios variables de cadena pesada (como los dominios VH o VHH). Un ejemplo específico de un dominio variable único de inmunoglobulina es un «dominio VHH» (o simplemente «VHH») tal y como se define a continuación.

«VHH», también conocido como anticuerpo de dominio único de cadena pesada, VHH, dominio $V_H H$, fragmento de anticuerpo VHH, anticuerpo VHH o nanocuerpo, es un dominio variable de una inmunoglobulina de unión a antígenos conocida como «anticuerpo de cadena pesada» (es decir, «un anticuerpo desprovisto de cadenas ligeras») (Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R., «Naturally occurring antibodies devoid of light chains»; Nature 363, 446-448 (1993)). «VHH» se utiliza para distinguir el dominio variable del dominio variable de la cadena pesada (al que en la presente divulgación se hace referencia como «dominio VH» o VH) y del dominio variable de la cadena ligera (al que en la presente divulgación se hace referencia como «dominio VL» o VL) presentes en los anticuerpos convencionales con una estructura de cuatro cadenas peptídicas. Un dominio VHH se une específicamente a un epítipo sin necesidad de un dominio de unión al antígeno adicional; dicho comportamiento de unión es diferente al del dominio VH o VL en un anticuerpo convencional con una estructura de cuatro cadenas peptídicas, en cuyo caso el dominio VL y el dominio VH reconocen el epítipo conjuntamente. Un dominio VHH es una unidad de reconocimiento de antígenos pequeña, estable y altamente eficiente formada por un único dominio de inmunoglobulina. Los términos «anticuerpo de cadena pesada de dominio único», «dominio VHH», «VHH», «dominio $V_H H$ », «fragmento de anticuerpo VHH», «anticuerpo VHH», «Nanobody®» y «dominio Nanobody®» («Nanobody» es una marca comercial de Ablynx N.V., Gante, Bélgica) se utilizan indistintamente. Los VHH incluyen, entre otros, anticuerpos naturales producidos por camélidos, anticuerpos producidos por camélidos y posteriormente humanizados, o anticuerpos obtenidos mediante cribado utilizando técnicas de presentación en fagos. El número total de residuos de aminoácidos en un VHH se encuentra generalmente en el rango de 110 a 120, típicamente entre 112 y 115. Sin embargo, cabe señalar que secuencias más cortas y más largas también pueden ser adecuadas para los fines descritos en la presente divulgación. Los métodos para obtener VHH que se unen a un antígeno o epítipo concreto se han divulgado anteriormente en los siguientes documentos: R. van der Linden et al., Journal of Immunological Methods, 240(2000) 185-195; Li et al., J Biol Chem., 287(2012) 13713-13721; Deffar et al., African Journal of Biotechnology Vol. 8(12), pp. 2645-2652, 17 de junio de 2009; y WO94/04678.

Como es bien sabido en la técnica para los dominios VH y los dominios VHH, el número total de residuos de aminoácidos en cada uno de los CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácidos indicado por la numeración de Kabat (es decir, una

o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácidos que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, en general, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácidos en la secuencia real.

5 Otros sistemas de numeración o esquemas de numeración incluyen Chothia, IMGT y AbM.

El «anticuerpo humanizado», también conocido como anticuerpo con injerto de CDR, se refiere a un anticuerpo producido mediante el injerto de secuencias de CDR no humanas en el marco de trabajo de las regiones variables de un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados pueden superar el problema de las fuertes respuestas inmunitarias inducidas por los anticuerpos quiméricos, que surgen debido a su significativo contenido de proteínas no humanas. Para evitar una disminución de la actividad causada por una disminución de la inmunogenicidad, las regiones variables de un anticuerpo totalmente humano pueden someterse a una mutación inversa mínima para mantener la actividad. Entre los ejemplos de «humanización» se incluye la «humanización» de dominios VHH derivados de camélidos mediante la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la secuencia VHH original por uno o más residuos de aminoácidos presentes en las posiciones correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo convencional humano con una estructura de cuatro cadenas peptídicas (denominada también en la presente divulgación «optimización de secuencia»; además de la humanización, la «optimización de la secuencia» también puede abarcar otras modificaciones de la secuencia mediante una o más mutaciones que proporcionen propiedades mejoradas del VHH, como la eliminación de posibles sitios de modificación postraduccional). Un dominio VHH humanizado puede comprender una o más secuencias de región marco totalmente humanas y, en algunas modalidades específicas, puede comprender la secuencia de región marco humana de IGHV3. Los métodos de humanización incluyen, por ejemplo, la humanización de aminoácidos de la superficie proteica (resurfacing) y el método de injerto de marco universal para la humanización de anticuerpos (injerto de CDR en un marco universal), es decir, el «injerto» de CDR en otros «andamios» (incluidos, entre otros, andamios humanos o andamios no inmunoglobulínicos). Los andamios y las técnicas adecuadas para dicho injerto de CDR son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal de los genes de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras humanas pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de la especie humana VBase, así como en Kabat, E. A. et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a edición. Los anticuerpos humanizados de la presente divulgación también incluyen anticuerpos humanizados que se someten además a maduración de afinidad de CDR mediante presentación en fagos. Además, con el fin de evitar una disminución de la actividad causada por una disminución de la inmunogenicidad, la secuencia del marco de trabajo en la región variable del anticuerpo humano puede someterse a una mutación inversa mínima o mutación de retroceso para mantener la actividad.

Un anticuerpo «con afinidad mejorada» es aquel que presenta uno o más cambios en una o más regiones hipervariables (HVR) que dan lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con el anticuerpo parental que no presenta dichos cambios. Por ejemplo, una proteína de unión a TRGV9 o un anticuerpo anti-TRGV9 «madurado en afinidad» comprende uno o más cambios en uno o más CDR que dan lugar a un aumento de la afinidad por el antígeno en comparación con su anticuerpo parental. Los anticuerpos con afinidad madurada pueden prepararse, por ejemplo, mediante métodos conocidos en la técnica tal y como se describe a continuación: Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783 o Barbas et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, EE. UU.* 91:3809-3813; Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton et al., 1995, *Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9; Hawkins et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 226(3):889-896; KS Johnson y RE Hawkins, «Affinity maturation of antibodies using phage display», Oxford University Press 1996.

Típicamente, la proteína de unión a GPC3/TRGV9 o la proteína de unión a TRGV9 de la presente divulgación puede unirse al antígeno o a la proteína diana a la que se va a unir (es decir, GPC3 o TRGV9) con una constante de disociación (K_D) de preferiblemente 10^{-7} a 10^{-10} mol/L (M), más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-10} mol/L, y aún más preferiblemente de 10^{-9} a 10^{-10} o menos, y/o con una constante de asociación (K_A) de al menos 10^{-7} M, preferiblemente de al menos 10^{-8} M, más preferiblemente de al menos 10^{-9} M, y más preferiblemente de al menos 10^{-10} M, según se mide en un ensayo Biacore, KinExA o Fortibio. Cualquier valor de K_D superior a 10^{-4} M se considera generalmente indicativo de unión no específica. La unión específica de una proteína de unión a antígenos a un antígeno o epítipo puede medirse de cualquier manera adecuada conocida, incluyendo, por ejemplo, el ensayo de resonancia plasmónica superficial (SPR), el ensayo de Scatchard y/o el ensayo de unión competitiva (p. ej., radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA) y ensayo competitivo tipo sándwich) descritos en la presente divulgación.

En la presente divulgación, los términos «afinidad de unión» o «afinidad» se utilizan como medida de la fuerza de una interacción no covalente entre dos moléculas (por ejemplo, un anticuerpo o una parte del mismo y un antígeno). La afinidad de unión entre dos moléculas puede cuantificarse determinando la constante de disociación (K_D). K_D puede determinarse midiendo la cinética de la formación y disociación del complejo utilizando, por ejemplo, el método de resonancia plasmónica superficial (SPR) (Biacore). Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y disociación de un complejo monovalente se denominan constante de velocidad de asociación k_a (o k_{on}) y constante de velocidad de disociación k_d (o k_{off}), respectivamente. K_D está relacionada con k_a y k_d mediante la ecuación $K_D = k_d/k_a$. El valor de la constante de disociación puede determinarse directamente mediante métodos bien conocidos, y los cálculos pueden realizarse incluso para mezclas complejas mediante, por ejemplo, los métodos descritos en Caceci et al (1984, *Byte* 9:340-362). Por ejemplo, K_D puede determinarse utilizando un ensayo de unión con filtro de nitrocelulosa de doble filtración, como el

descrito por Wong y Lohman (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5428-5432). En la técnica se conocen otros ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de un anticuerpo a un antígeno diana, que incluyen, por ejemplo, ELISA, western blot, RIA y citometría de flujo, así como otros ensayos ejemplificados en otras partes de la presente divulgación. La cinética de unión y la afinidad de unión del anticuerpo también pueden evaluarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, como la resonancia plasmónica superficial (SPR), por ejemplo, utilizando el sistema Biacore® o KinExA. Las afinidades de unión asociadas a diferentes interacciones moleculares, p. ej., las afinidades de unión de diferentes anticuerpos por un antígeno dado, pueden compararse comparando los valores K_D de los complejos anticuerpo/antígeno. De manera similar, la especificidad de una interacción puede evaluarse determinando y comparando el valor K_D de la interacción de interés (por ejemplo, una interacción específica entre un anticuerpo y un antígeno) con el valor K_D de una interacción que no es de interés (por ejemplo, un anticuerpo de control del que se sabe que no se une a IGF-1R o TRGV9).

El «sustitución conservadora» se refiere a la sustitución por otro residuo de aminoácido que tenga propiedades similares a las del residuo de aminoácido original. Por ejemplo, la lisina, la arginina y la histidina tienen propiedades similares en cuanto a que poseen cadenas laterales básicas, y el ácido aspártico y el ácido glutámico tienen propiedades similares en cuanto a que poseen cadenas laterales ácidas. Además, la glicina, la asparagina, la glutamina, la serina, la treonina, la tirosina, la cisteína y el triptófano tienen propiedades similares, ya que poseen cadenas laterales polares sin carga, y la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina y la metionina tienen propiedades similares, ya que poseen cadenas laterales no polares. Además, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano y la histidina tienen propiedades similares, ya que poseen cadenas laterales aromáticas. Por lo tanto, resultará evidente para los expertos en la materia que, incluso cuando se sustituya un residuo de aminoácido en un grupo que presente propiedades similares a las descritas anteriormente, no se producirá un cambio particular en las propiedades.

«Homología», «identidad» o «identidad de secuencia» se refieren a la similitud de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos o entre dos polipéptidos. Cuando las posiciones en dos secuencias comparadas están ocupadas por nucleótidos o monómeros de aminoácidos idénticos, por ejemplo, si la posición de cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por un nucleótido idéntico, las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas $\times 100\%$. Por ejemplo, si 6 de cada 10 posiciones coinciden o son homólogas cuando dos secuencias se alinean de forma óptima, las dos secuencias son homólogas en un 60 %. En general, se realiza una comparación cuando se alinean dos secuencias para obtener el máximo porcentaje de homología.

La «cadena T de titina» o «cadena T» se refiere a un fragmento peptídico de 78-118 aminoácidos que comprende un dominio 152 similar a Ig de la titina en una proteína de titina o una variante funcional de la misma, y la cadena T de titina es capaz de unirse al dominio 1 similar a Ig de la obscurina para formar un complejo dimérico. La variante funcional de la cadena T se

5 obtiene mutando algunos aminoácidos de una cadena T de tipo salvaje, pero sigue teniendo un polipéptido que se une al dominio 1 similar a Obscurin Ig para formar un complejo dimérico. Por ejemplo, se añade o se elimina un número adecuado de aminoácidos del extremo C-terminal y/o del extremo N-terminal del dominio similar a Ig 152 de la titina; pueden añadirse o eliminarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos; por ejemplo, los 5 aminoácidos «KAGIR» de

10 5 proteínas de titina de tipo salvaje que se encuentran inmediatamente adyacentes al extremo N-terminal del dominio 152 de tipo Ig de la titina se añaden al extremo N-terminal del dominio 152 de tipo Ig de la titina, y este sigue teniendo la función de unirse al dominio 1 de tipo Ig de la obscurina para formar un complejo. Los aminoácidos del dominio 152 tipo Ig de la titina también pueden sufrir otras mutaciones; por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden mutar para mejorar los

15 enlaces disulfuro entre cadenas, aumentar la estabilidad del complejo, etc.

La «cadena O de obscurina» o «cadena O» se refiere a un fragmento peptídico de 87-117 aminoácidos que comprende un dominio 1 similar a Ig de la obscurina en una proteína de obscurina o una variante funcional de la misma, y la cadena O de obscurina es capaz de unirse al dominio 152 similar a Ig de la titina para formar un complejo dimérico. La variante funcional de

20 la cadena Obscurin-O se obtiene mutando algunos aminoácidos de una cadena O de tipo salvaje, pero sigue teniendo un polipéptido que se une al dominio 152 de tipo Ig de la titina para formar un complejo dimérico. Por ejemplo, se añaden o eliminan un número adecuado de aminoácidos del extremo C-terminal y/o del extremo N-terminal del dominio de la Obscurina-O; por ejemplo, se añaden o eliminan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos; por ejemplo, los 5 aminoácidos

25 «DQPQF» de 5 proteínas de obscurina de tipo salvaje que se encuentran inmediatamente adyacentes al extremo N-terminal del dominio 1 de tipo Ig de la obscurina se añaden al extremo N-terminal del dominio de la obscurina-O, y este sigue teniendo la función de unirse al dominio 152 de tipo Ig de la titina para formar un complejo dimérico. Algunos aminoácidos del dominio 1 similar a Ig de la obscurina también pueden sufrir otras mutaciones; por ejemplo, ciertos

30 aminoácidos pueden mutar para mejorar los enlaces disulfuro entre cadenas, aumentar la estabilidad del anticuerpo, etc.

Los términos «ácido nucleico» y «polinucleótido» se utilizan indistintamente en la presente divulgación para referirse a cualquier molécula de ADN o ARN, ya sea de cadena simple o doble, y, si es de cadena simple, a la molécula de su secuencia complementaria,

35 preferiblemente un ADN de doble cadena. Un ácido nucleico está «vinculado de forma operativa» cuando se establece una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o un potenciador está vinculado de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de dicha secuencia.

El término «célula huésped» incluye células individuales o cultivos celulares, que pueden ser o haber sido receptoras de un vector para la incorporación de un inserto de polinucleótido. La célula huésped incluye la descendencia de una sola célula huésped, y dicha descendencia no tiene por qué ser idéntica (en morfología o en el complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a mutaciones naturales, accidentales o intencionadas. La célula huésped incluye células transfectadas y/o transformadas *in vivo* con el polinucleótido de la presente divulgación. Los términos «célula», «línea celular» y «cultivo celular» se utilizan indistintamente, y todas estas denominaciones incluyen a su progenie. También debe entenderse que es posible que no toda la progenie sea exactamente idéntica en cuanto a contenido de ADN debido a mutaciones intencionadas o no intencionadas. Se incluye la progenie mutante que tenga la misma función o actividad biológica que la seleccionada en las células transformadas inicialmente.

«Inhibición» y «bloqueo» se utilizan indistintamente y abarcan tanto la inhibición/bloqueo parcial como el completo. La «inhibición del crecimiento» (por ejemplo, en células) pretende incluir cualquier reducción medible del crecimiento celular.

«Administrar», «suministrar» y «tratar», cuando se aplican a animales, seres humanos, sujetos experimentales, células, tejidos, órganos o fluidos biológicos, se refieren al contacto de un fármaco exógeno, un agente terapéutico, un agente diagnóstico o una composición con los animales, seres humanos, sujetos, células, tejidos, órganos o fluidos biológicos, por ejemplo, métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación y experimentales. El tratamiento de células comprende el contacto entre un reactivo y las células, y el contacto entre el reactivo y un fluido, en el que el fluido está en contacto con las células. «Administrar», «suministrar» y «tratar» también significan tratar, por ejemplo, una célula mediante un reactivo, un diagnóstico, una composición de unión o mediante otra célula *in vitro* y *ex vivo*. Cuando se aplican a seres humanos, medicina veterinaria o sujetos de investigación, se refieren a tratamiento terapéutico, medidas preventivas o profilácticas, y aplicaciones de investigación y diagnóstico.

«Tratar» o «tratamiento» se refiere a la administración de un agente terapéutico, como un agente terapéutico que comprenda cualquiera de las proteínas de unión de la presente divulgación o una composición farmacéutica del mismo, ya sea por vía interna o externa, a un sujeto que haya padecido, se sospeche que padezca o esté predispuesto a padecer una o más enfermedades proliferativas o síntomas de las mismas sobre las que se sabe que el agente terapéutico tiene un efecto terapéutico. Normalmente, el agente terapéutico se administra en una cantidad eficaz para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad en el sujeto o la población que se está tratando, ya sea induciendo la regresión de dichos síntomas o inhibiendo la progresión de los mismos en cualquier grado clínicamente medible. La cantidad de agente terapéutico eficaz para aliviar cualquier síntoma específico de la enfermedad (también denominada «cantidad terapéuticamente eficaz») puede variar en función de factores tales como el estado de la

enfermedad, la edad y el peso corporal del sujeto, así como la capacidad del fármaco para producir el efecto terapéutico deseado en el sujeto. La paliación de un síntoma de la enfermedad puede evaluarse mediante cualquier método de prueba clínica comúnmente utilizado por médicos u otros profesionales sanitarios para evaluar la gravedad o la progresión del síntoma.

- 5 Aunque las modalidades de la presente divulgación (por ejemplo, métodos de tratamiento o artículos de fabricación) pueden resultar ineficaces para aliviar un síntoma de la enfermedad de interés en un sujeto determinado, se evaluarán el síntoma de la enfermedad de interés en un número estadísticamente significativo de sujetos, según se determine mediante cualquier método de prueba estadística conocido en la técnica, como la prueba t de Student, la prueba de chi-cuadrado, la prueba U de Mann y Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis (prueba H), la prueba de Jonckheere-Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

La «cantidad eficaz» comprende una cantidad suficiente para mejorar o prevenir un síntoma o signo de un trastorno médico. Una cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. La cantidad eficaz para un sujeto puede variar en función de factores tales como el trastorno que se va a tratar, el estado de salud general del sujeto, el método, la vía y la dosis de administración, y la gravedad de los efectos secundarios. Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o el régimen de administración que permita evitar efectos secundarios significativos o efectos tóxicos. Un sujeto de la presente divulgación puede ser un animal o un sujeto humano.

- 20 «Opcional» u «opcionalmente» significa que el evento o circunstancia descrito a continuación puede, pero no necesariamente, ocurrir. Esta descripción incluye el caso en que el evento o circunstancia ocurra o no ocurra. «y/o» debe interpretarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados, con o sin el otro. Por lo tanto, el término «y/o», tal y como se utiliza en una frase como «A y/o B» en la presente divulgación, incluye «A y B», «A o B», «A» (solo) y «B» (solo). A menos que el contexto requiera claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras «comprender», «tener», «incluir», etc., deben entenderse en un sentido inclusivo, en contraposición a un sentido exclusivo o exhaustivo, es decir, en el sentido de «incluyendo, pero sin limitarse a». En el contexto de las mutaciones contenidas en la región Fc de la presente divulgación, «/» representa «y»; por ejemplo, «354C/366W» representa «354C y 366W»; es decir, el Fc comprende las mutaciones 354C y 366W; las posiciones de los aminoácidos de las mutaciones en la región Fc de la presente divulgación se numeran según el esquema de numeración de la UE.

El «sujeto» o «paciente» en la presente divulgación significa un mamífero, en particular un primate, y especialmente un ser humano.

Ejemplos

La presente divulgación se describe con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos; sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

Los procedimientos experimentales sin condiciones específicas indicadas en los ejemplos o ejemplos de ensayo de la presente divulgación se llevan a cabo generalmente en condiciones convencionales, o en condiciones recomendadas por los fabricantes de los materiales de partida o productos comerciales. Véase Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY. Los reactivos sin fuentes específicas indicadas eran reactivos convencionales disponibles en el mercado.

Ejemplo 1. Diseño y preparación de antígenos

El TCR en la superficie de una célula T $\gamma\delta$ (receptor de células T $\gamma\delta$) es una proteína de membrana heterodimérica formada por la formación de un complejo de una cadena γ y una cadena δ . Se seleccionaron los aminoácidos en las posiciones 1-242 de la cadena γ 9 de la proteína de la región extracelular del TCR $\gamma\delta$ humano (Banco de datos de proteínas, No. 1HXM, cadena B), y se añadieron secuencialmente al extremo C-terminal un sitio de corte de la enzima 3C, una cremallera de leucina y una etiqueta FLAG; se seleccionaron los aminoácidos en las posiciones 1-229 de la cadena δ 2 de la región extracelular de la proteína $\gamma\delta$ TCR humana (Banco de datos de proteínas, No. 1HXM, cadena A), y se añadieron secuencialmente al extremo C-terminal un sitio de corte de la enzima 3C, una cremallera de leucina y una etiqueta His8. Además, se introdujeron las mutaciones Q180C y V168C en las regiones constantes de la cadena γ y la cadena δ , respectivamente, para formar un enlace disulfuro entre cadenas.

Se seleccionó una proteína TCR $\gamma\delta$ 2 recombinante de mono (Macaca mulatta): los aminoácidos en las posiciones 1-241 de la cadena γ 9 del mono (véase la secuencia en SEQ ID NO: 42 de la patente publicada No. US2019144540A1) y se añadieron secuencialmente al extremo C-terminal un sitio de corte de la enzima 3C, una cremallera de leucina y una etiqueta FLAG; se seleccionaron los aminoácidos en las posiciones 1-229 de la cadena δ 2 de mono (véase la secuencia en SEQ ID NO: 37 de la patente publicada NOs US20190144540A1), y se añadieron secuencialmente al extremo C-terminal un sitio de corte de la enzima 3C, una cremallera de leucina y una etiqueta His8; además, se introdujeron las mutaciones Q179C y V168C en las regiones constantes de la cadena γ y la cadena δ , respectivamente, para formar un enlace disulfuro entre cadenas.

> Cadena γ 9 humana recombinante

AGHLEQPQISSTKTL SKTARLECVVSGITISATSVYWYRERPGEVIQFLVSISYDGTVRK
ESGIPSGKFEVD RIPETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEAQQELGKKIKVFGPGTKLIITDKQL
DADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWEKKSNLILGSCGNTMKTNDTYM
 KFSWLTVPKSLDKHEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKDNGSGLEVLFGPGSG
 AQLEKELQALEKENAQLEWELQALEKELAQKGS GDYKDDDDK (SEQ ID NO: 1)

> Cadena $\delta 2$ humana recombinante

AIELVPEHQTVPSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNTMTFIYREKDIYGPGF
KDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDTLGMGGEYTDKLIFGKGTRVTVEPRSQPH
TKPSVFVMKNGTNAVACLKVEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAICISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVT
 5 CSVQHDNKT VHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSGSGLEVLFGPGSGAQLKKKLQA
 LKKKNAQLKWKLQALKKKLAQKSGSGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 2)

> Cadena $\gamma 9$ recombinante de mono

AGHLEQPQISSTKMLSKTARLECVVSGVTISETSIYWYRERPGEVIQFLVCIFYDGTVKK
ESSIPSGKFEVDRIPKTSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEVQQFGRKVKLFGPGTKLIITDKHLD
 10 ADVSPKPTIFLPSIAETNLHKAGTYLCLLENFFPDVIKIHWQEKKSENTILGSCEGNTVKTNDTYMK
 FSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVTTMDPKDNGSGLEVLFGPGSGA
 QLEKELQALEKENAQLQEWELQALEKELAQKSGSDYKDDDDK (SEQ ID NO: 3)

> Cadena $\delta 2$ recombinante de mono

AVELVPEHQTVIVSVGDPATLKCSMKGEAISNYYINWYRKTQGNTMTFIYREKGIYGPG
 15 FKNDFQGDIDTEENQAVLKILAPSERDEGSYYCASDILSWVDSYTDKLIFGKGTRVTVEPKRQP
HTKPSVFVMKNGTNAVACLKDFYGKDIRINLESSKKITEFDPAICVSPSGKYNAVKLGQYADSN
 SVTCSVQHNKEVVYSTDFEVKTNSTDHLKPTETENTKQPSKSGSGLEVLFGPGSGAQLKKKL
 QALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQKSGSGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 4)

Se sintetizaron por separado plásmidos que portaban genes que codificaban las proteínas
 20 diana. Los plásmidos de la cadena $\gamma 9$ humana (SEQ ID NO: 1) y de la cadena $\delta 2$ humana (SEQ
 ID NO: 2) se mezclaron en una proporción de 1:1, y los plásmidos de la cadena $\gamma 9$ de mono
 (SEQ ID NO: 3) y de la cadena $\delta 2$ de mono (SEQ ID NO: 4) se mezclaron en una proporción de
 1:1. Las mezclas resultantes se transfectaron de forma transitoria y por separado en células
 Expi293 (adquiridas a Thermo) y se expresaron durante 7 días. Tras la separación y purificación,
 25 se obtuvieron una proteína TCR $\gamma\delta 2$ humana y una proteína TCR $\gamma\delta 2$ de mono. Las proteínas
 se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

Ejemplo 2. Cribado de anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR

1. Cribado de anticuerpos de dominio único anti- $\gamma\delta$ TCR

Se utilizaron células T $\gamma\delta 2$ humanas expandidas *in vitro* como inmunógeno para
 30 inmunizar a alpacas adultas sanas. Se utilizó la proteína TCR $\gamma\delta 2$ humana recombinante del
 ejemplo 1 para cribar un anticuerpo específico mediante presentación en fagos.

Concretamente, la dosis de inmunización primaria fue de 2×10^7 células por alpaca. Tres
 semanas después de la dosis de inmunización primaria, se administró una dosis de refuerzo (2×10^7
 células por alpaca). Las dosis de refuerzo posteriores se administraron a intervalos de tres
 35 semanas. Se recogieron muestras de suero una semana después de cada dosis de refuerzo, y
 el título de anticuerpos en el suero de las alpacas se determinó mediante ELISA de proteínas y
 FACS.

El ELISA de proteínas específico se realizó de la siguiente manera: la proteína TCR $\gamma\delta 2$ humana recombinante se diluyó a 2 $\mu\text{g/mL}$ con un tampón de carbonato 0.05 M (pH 9.6), y se recubrió una placa con la solución (100 $\mu\text{L/pocillo}$) a 4 °C durante toda la noche. La placa se bloqueó con un tampón PBST que contenía un 5 % de leche desnatada durante 1 h y se lavó 3 veces. El suero de alpaca se diluyó en serie al doble en el tampón de bloqueo (comenzando en 1:2000). Tras 45 min de incubación a 37 °C, la placa se lavó 5 veces. Se añadieron 100 μL de un anticuerpo secundario de cabra anti-alpaca marcado con peroxidasa de rábano picante (AlpVHHs, 053-404-005, diluido con PBS en una proporción de 1:10 000) a cada pocillo, y la placa se incubó a 37 °C durante 45 minutos y se lavó 5 veces. Por último, se añadieron 100 μL de una solución cromogénica de TMB a cada pocillo para el desarrollo del color. Tras 5 minutos, se añadieron 50 μL de una solución de parada para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

El ensayo específico por FACS fue el siguiente: se recogieron las células y se resuspendieron a 4E6 células/mL, y se añadieron 50 μL de la suspensión celular al suero de alpaca diluido en serie. La mezcla resultante se incubó a 4 °C durante 1 h. Las células se lavaron dos veces con un tampón de BSA al 1 %/PBS, y a continuación se deseó el sobrenadante. Se añadió IgG anti-alpaca iFluor647 (AlpVHHs, 053-404-009, diluido en una proporción de 1:200) y las células se incubaron en un lugar oscuro a 4 °C durante 45 minutos. Las células se lavaron dos veces con un tampón de BSA/PBS al 1 %, se resuspendieron en 200 μL del tampón y, a continuación, se analizaron mediante FACS.

Según el análisis, el título sérico de las alpacas inmunizadas fue superior a 128 k.

Tras tres dosis de inmunización, se extrajeron 50 mL de sangre periférica una semana después de cada dosis de inmunización y se aislaron los linfocitos (PBMC). Se extrajo el ARN total de las PBMC utilizando un reactivo RNAiso Plus para establecer una biblioteca de fagos con un título de $3.08 \times E13$ ufc/mL.

Los anticuerpos contra la proteína TCR $\gamma\delta 2$ humana recombinante se seleccionaron mediante presentación en fagos. Los anticuerpos que se unían de forma cruzada a la proteína TCR $\gamma\delta 2$ de mono se identificaron mediante ELISA. La actividad de unión a las células T $\gamma\delta 2$ humanas expandidas *in vitro* se determinó mediante FACS. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal de dominio único positivo utilizando los métodos ELISA y FACS mencionados anteriormente. Su secuencia se muestra a continuación.

> La región variable de SDP01346 (clon No. ac-025)

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGSTFSDFAMGWLRLQAPGKEREFVAAISWTGG
RTYYADSVKGRFAISRDNAGENTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAASRDSCGPGCRVHEYDYWGQG
TQVTVSS (SEQ ID NO: 5)

Tabla 1. Secuencias CDR de un anticuerpo de dominio único anti- $\gamma\delta$ TCR humano (esquema de numeración de Kabat)

No. de anticuerpo	Secuencias CDR	No. de secuencia
-------------------	----------------	------------------

SDP01346	CDR1	DFAMG	SEQ ID NO: 6
	CDR2	AISWTGGRTYYADSVKG	NOs de secuencia: 7
	CDR3	SRDCSGPGRCRVHEYDY	NOs de identificación de secuencia: 8

2. Cribado de anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR de origen murino

5 Se utilizaron células T $\gamma\delta$ 2 humanas expandidas *in vitro* como inmunógeno para inmunizar ratones Balb/c y SJL de 6-8 semanas de edad. Se utilizó la proteína TCR $\gamma\delta$ 2 humana recombinante del Ejemplo 1 para seleccionar un anticuerpo específico mediante fusión de hibridomas.

10 Concretamente, la dosis de inmunización primaria fue de $1E7$ células por ratón. Dos semanas después de la dosis de inmunización primaria, se administró una dosis de refuerzo ($1E7$ células por ratón). Las dosis de refuerzo posteriores se administraron a intervalos de 2-3 semanas. Se recogieron muestras de suero una semana después de cada dosis de refuerzo, y se evaluó la actividad de los anticuerpos en el suero de ratón mediante ELISA de proteínas y FACS.

15 El ELISA de proteínas específico se realizó de la siguiente manera: se recubrió una placa con $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ de proteína TCR $\gamma\delta$ 2 humana recombinante a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche, se bloqueó con un tampón PBST que contenía un 1 % de BSA durante 1 h y se lavó tres veces. El suero de ratón se diluyó en serie tres veces en el tampón de bloqueo (comenzando en una proporción de 1:200). Tras 1 h de incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, la placa se lavó tres veces y se incubó con
20 un anticuerpo secundario anti-IgG-Fc-HRP de ratón (Sigma, AP127P, diluido en una proporción de 1:10 000) durante 1 h. La placa se lavó tres veces con PBST y se añadieron $100\text{ }\mu\text{L}$ de una solución cromogénica de TMB a cada pocillo para el desarrollo del color. Tras 15 minutos, la reacción se detuvo utilizando una solución de parada. Se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

25 El ensayo específico por FACS fue el siguiente: se sembraron las células a $1E5$ células por pocillo. Se centrifugó la placa y se desechó el sobrenadante. Se añadió el suero de ratón diluido en serie. La placa se incubó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Las células se lavaron dos veces con un tampón de BSA al 1 %/PBS y, a continuación, se desechó el sobrenadante. Se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa Flour 488 (Jackson Immuno Research, 115-545-
30 071, diluido en una proporción de 1:500) y las células se incubaron en un lugar oscuro a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con un tampón de BSA al 1 % en PBS, se resuspendieron en $200\text{ }\mu\text{L}$ del tampón y, a continuación, se analizaron mediante FACS. El título sérico de los ratones inmunizados fue superior a 72,900.

35 Como última dosis de inmunización, se inyectaron por vía intraperitoneal $50\text{ }\mu\text{g}$ de la proteína TCR $\gamma\delta$ 2 humana recombinante. Tras 4 días, se sacrificaron los ratones, se extrajeron sus bazo y se trituraron. Se recogieron las células del bazo y se mezclaron con células de mieloma de ratón (SP2/0), y la mezcla celular se sometió a electrofusión para obtener células de hibridoma. Los clones positivos con una DO a 450 nm > 0.2 se sometieron a pruebas adicionales

mediante FACS, y los clones positivos que se unían a las células T $\gamma\delta$ 2 humanas con un valor de MFI > 5000 se subclonaron. Tras el cribado primario y la repetición de las pruebas de los subclones, se seleccionó un anticuerpo anti- $\gamma\delta$ TCR de origen murino utilizando los métodos ELISA y FACS mencionados anteriormente. A continuación se muestran las secuencias de

> El VH de SDP01315 (clon No. bph-003)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGST
YYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARDGYPPFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ
 ID NO: 9)

> La VL de SDP01315 (clon No. bph-003)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSG
 VPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSFPLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)

Tabla 2. Las secuencias CDR de un anticuerpo anti- $\gamma\delta$ TCR derivado de ratón
 (esquema de numeración de Kabat)

No. de anticuerpo	Secuencias CDR		No. de secuencia
SDP01315	HCDR1	SYAMS	SEQ ID NO: 11
	HCDR2	SISSGGSTYYPDSVKG	SEQ ID NO: 12
	HCDR3	DGYPPFDY	SEQ ID NO: 13
	LCDR1	KASQNVGTNVA	SEQ ID NO: 14
	LCDR2	SASYRYS	SEQ ID NO: 15
	LCDR3	QQYNSFPLT	SEQ ID NO: 16

Ejemplo 3. Construcción de anticuerpos quiméricos anti- $\gamma\delta$ TCR y verificación del efecto funcional

1. Expresión de anticuerpos quiméricos

Anticuerpo de dominio único: se clonó una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo en un vector pTT5 y, a continuación, se transfectaron células ExpiCHO con el vector. Tras 8 días, se retiraron las células mediante centrifugación y se recogió y filtró la solución de cultivo celular. La solución de cultivo celular recogida se purificó utilizando una columna de afinidad de níquel (HisTrap excel, GE), y el anticuerpo unido se eluyó con 300 mM de imidazol, se desaló y se sometió a un intercambio de tampón a PBS para obtener el anticuerpo objetivo.

> Secuencia completa de SDP01346

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGSTFSDFAMGWLRAAPGKEREFVAAISWTGG
 RTYYADSVKGRFAISRDNAGENTVYLYQMNSLKSEDTAIYYCAASRDGSGPGCRVHEYDYWGQG
 TQVTVSSGGGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 17)

Anticuerpo derivado de ratón: Las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo se clonaron en un vector pTT5 y, a continuación, se transfectaron células ExpiCHO con el vector. Tras 8 días, se retiraron las células mediante centrifugación y se recogió y filtró la solución de cultivo celular. La solución de cultivo celular recogida se purificó utilizando una columna de

afinidad de proteína A (MabSelect SuRe, GE), y el anticuerpo unido se eluyó con glicina. El eluido se neutralizó con Tris 1 M y, a continuación, se desaló para obtener el anticuerpo objetivo.

> La cadena pesada completa de SDP01315

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGST
 5 YYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARDGYPPFDYWGGQTTLTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 10 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18)

> La cadena ligera de longitud completa de SDP01315

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS
 VPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSFPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 15 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)

2. Unión de anticuerpos quiméricos a las células T γ9δ2

El proceso de medición de la afinidad a nivel celular del anticuerpo de dominio único anti-γδTCR fue el siguiente: la molécula de anticuerpo diluida en serie se incubó con 1×10^5 células
 20 T γ9δ2 a 4 °C durante 1 h, y se eliminó el exceso de anticuerpo mediante lavado. Se añadió el anticuerpo DyLight 405-AffiniPure de cabra anti-IgG de alpaca, dominio VHH (Jackson, # de cat. 128-475-232), y las células se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, las células se resuspendieron en 200 μL de un tampón PBS con un 2 % de FBS, y las señales de fluorescencia en la superficie celular se midieron utilizando un citómetro de flujo
 25 Thermo Attune NxT. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

El proceso de medición de la afinidad a nivel celular del anticuerpo anti-γδTCR de origen murino fue el siguiente: la molécula de anticuerpo diluida en serie se incubó con 1×10^5 células
 30 T γ9δ2 a 4 °C durante 1 h, y se eliminó el exceso de anticuerpo mediante lavado. Se añadió el anticuerpo anti-Fc humano marcado con Alexa Flour 647 de origen murino (Jackson, # de cat. 209-605-098) y las células se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, las células se resuspendieron en 200 μL de un tampón PBS con un 2 % de FBS, y las señales de fluorescencia en la superficie celular se midieron utilizando un citómetro de flujo Thermo Attune NxT. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Capacidad de unión de los anticuerpos quiméricos anti-γδTCR

35

No. de anticuerpo	Unión a células T γ9δ2	
	EC ₅₀ (nM)	MFI máx.
SDP01346	0.44	3279
SDP01315	0.99	11123

Los resultados muestran que SDP01346 y SDP01315 mostraron una buena actividad de unión a las células T $\gamma\delta 2$.

Ejemplo 4. Identificación de las regiones antigénicas a las que se unen los anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR

5 En este ejemplo, se identificaron las regiones antigénicas a las que se unen los anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR mediante ELISA basado en proteínas. Una proteína TCR $\gamma\delta 1$ humana recombinante (una proteína dimérica de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 20), una proteína TCR $\gamma\delta 2$ humana recombinante (una proteína dimérica de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 2), una proteína TCR quimérica $V\gamma\delta C\alpha\beta$ humana recombinante (una proteína dimérica de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23) y una proteína TCR quimérica humana recombinante $V\alpha\beta C\gamma\delta$ (una proteína dimérica de SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25) se prepararon utilizando un método similar al del Ejemplo 1.

La actividad de unión de los anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR a los antígenos descritos anteriormente se evaluó mediante ELISA para identificar las regiones generales a las que se unen los anticuerpos. El ELISA de proteínas específico se realizó de la siguiente manera: se recubrió una placa con 1 μ g/mL de proteína TCR recombinante a 4 °C durante toda la noche, se bloqueó con un tampón PBST que contenía un 1 % de BSA durante 1 h y se lavó tres veces. Los anticuerpos se diluyeron a 30 nM con un tampón de bloqueo. Tras 1 h de incubación a 37 °C, la placa se lavó tres veces y se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-Fc-HRP (Sigma, AP127P, diluido en una proporción de 1:10 000) durante 1 h. La placa se lavó tres veces con PBST y se añadieron 100 μ L de una solución cromogénica de TMB a cada pocillo para el desarrollo del color. Tras 15 minutos, la reacción se detuvo utilizando una solución de parada. Se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

> Cadena $\delta 1$ humana recombinante

25 AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSDEQNA
KSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGVRAFLRDWGIRVLIFGKGTRVTVEPRSQ
PHTKPSVFMKNGTNVACLVEFYKPKDIRINLVSSKKITEFDPAICISPSGKYNAVKLGKYEDSN
SVTCSVQHDNKT VHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSGSGLEVLFFQGP GSGAQLKKK
LQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQKSGSGHHHHHHHH (SEQ ID NO: 20)

30 > Cadena $\gamma 8$ humana recombinante

ADLSSNLEGRTKSVTRPTGSSAVITCDLPVENAVYTHWYLVHQEGKAPQRLLYYDSYNS
RVVLESGISREKYHTYASTGKSLKFILENLIERDSGVYYCATWASSDWIKTFAGTRLIVTSPDK
QLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDIIKIHWQEKKSNTILGSCEGNTMKTN
YMKFSWLTVP EESLDKEHRCIVRHENNKNGIDQEIIFFPIKTDVTTVDPKYNYSKDANDVITMDP
35 KDNGSGLEVLFFQGP GSGAQLKELQALEKENAQLWELQALEKELAQKSGDYKDDDDK
(SEQ ID NO: 21)

> Cadena $V\gamma 9 C\beta$ humana recombinante

AGHLEQPQISSTKTLSTARLECVVSGITISATSVYWYRERPGEVIQFLVSISYDGTVRK
 ESGIPSGKFEVDRIPETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEVHELGGKIKVFGPGTKLIITEDLKNV
 FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL
 NDSRYSLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTQIVSAEAWGRAD
 5 SGSGLEVLFFQGP GSGAQLKEKELQALEKENAQLWELQALEKELAQKSGSDYKDDDDK

(SEQ ID NO: 22)

> Cadena V δ 2C α humana recombinante

AIELVPEHQTPVPSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNTMTFIYREKDIYGPGF
 KDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDPVQVTGGYKVDKLIFGKGTRVTEPNIQNP
 10 DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSN
 KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSSGSGLEVLFFQGP GSGAQLKKKLQALKKKNAQLKWKL
 QALKKKLAQKSGSGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 23)

> Cadena V β 7C γ humana recombinante

GVSQTPSNKVTEKGKYVELRCDPISGHTALYWYRQSLGQGPEFLIYFQGTGAADDSGL
 15 PNDRFFAVRPEGSVSTLKIQRTERGDSAVYLCATSALGDTQYFGPGTRLTVLDKQLDADVSPK
 PTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKHWEEKKSNTILGSCEGNTMKTNDTYMKFSWLTV
 PEKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKDNGSGLEVLFFQGP GSGAQLKEKEL
 QALEKENAQLWELQALEKELAQKSGSDYKDDDDK (SEQ ID NO: 24)

> Cadena V α 13C δ humana recombinante

ENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGEKKDQ
 20 RIAVTLNKTAKHFS LHITETQPEDSAVYFCAASSFGNEKLTFGTGTRLTIIPSQPHTKPSVFMKN
 GTNVACLVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAICISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQHDNKT
 VHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSGSGLEVLFFQGP GSGAQLKKKLQALKKKNAQLK
 WKLQALKKKLAQKSGSGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 25)

25 Los resultados del ELISA se muestran en la Tabla 4. Los valores de absorbancia de unión
 de los anticuerpos SDP01346 y SDP01315 a diferentes antígenos fueron diferentes. Ambos
 anticuerpos se unieron a la proteína TCR $\gamma\delta$ 1 y no a la proteína TCR $\gamma\delta$ 2, lo que indica que
 los anticuerpos se unieron a la cadena γ 9. Los dos anticuerpos se unieron a la proteína TCR
 quimérica V $\gamma\delta$ C $\alpha\beta$ y no a la TCR quimérica V $\alpha\beta$ C $\gamma\delta$, lo que indica que los anticuerpos se unieron
 30 a la región variable del TCR (región V). En resumen, quedó claro que los anticuerpos SDP01346
 y SDP01315 se unieron a TRGV9.

Tabla 4. Resultados de la identificación de las regiones antigénicas a las que se unen los
 anticuerpos quiméricos

No. de anticuerpo	TCR $\gamma\delta$ 2 humano	TCR $\gamma\delta$ 2 de mono	TCR $\gamma\delta$ 1 humano	TCR $\gamma\delta$ 2 humano	TCR quimérico V $\gamma\delta$ C $\alpha\beta$	TCR quimérico V $\alpha\beta$ C $\gamma\delta$
SDP01346	3.52	0.769	2.444	0.108	2.345	0.094
SDP01315	3.71	1.646	3.057	0.192	3.045	0.176

Ejemplo 5. Ingeniería de humanización de anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR

Las secuencias de la región variable se compararon con una base de datos de anticuerpos germinales para obtener plantillas germinales humanas con alta homología. La plantilla de cadena pesada germinal humana utilizada para SDP01346 fue IGHV3-30. La plantilla de cadena pesada de la línea germinal humana utilizada para SDP01315 fue IGHV3-21, y la
 5 plantilla de cadena ligera de la línea germinal humana fue IGKV1-12. Tras predecir las estructuras de los anticuerpos monoclonales mediante modelado por homología, se injertaron las regiones VH y VL del anticuerpo derivado de ratón o los CDR del anticuerpo de dominio único en un marco de trabajo adecuado de la línea germinal humana (Bioinformation. 2014; 10(4):180-186; Methods Mol Biol. 2019;1904:213-230), y posteriormente se introdujeron mutaciones
 10 inversas.

Las secuencias de las moléculas humanizadas obtenidas se muestran a continuación:

> SDP01346 VH1

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFSDFAMGWLRQAPGKGRFVAAISWTGG
 RTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPGCRVHEYDYWGQ
 15 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)

> SDP01346 VH2

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWTGG
 RTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPGCRVHEYDYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)

> SDP01346 VH3

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWTGG
 RTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAASRDCSGPGCRVHEYDYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)

> SDP01346 VH4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWTGGR
 TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPGCRVHEYDYWGQ
 TLVTVSS (SEQ ID NO: 29)

> SDP01315 VH1

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVSSISGGST
 30 YYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWGQGTTVTVSS
 (SEQ ID NO: 30)

> SDP01315 VH2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISGGST
YYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO: 31)

> SDP01315 VH3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISSGGST
 YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 32)

> SDP01315 VL1

5 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
 PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:
 33)

> SDP01315 VL2

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYS
 10 PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:
 34)

> SDP01315 VL3

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKSPKALIYSASYRYS
 15 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYNSFPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:
 35)

Tras la humanización del anticuerpo de dominio único, se construyó un anticuerpo de longitud completa; se añadió GGGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 72) después del VHH correspondiente. Alternativamente, tras la humanización del anticuerpo de dominio único, se construyó un anticuerpo de longitud completa; se añadieron un enlazador y un Fc después del VHH correspondiente.

Tras la humanización del anticuerpo de origen murino, se construyó un anticuerpo de longitud completa; la región constante de la cadena ligera utilizada fue una Cκ, y la región constante de la cadena pesada utilizada fue IgG1 con las mutaciones L234F y L235E.

Tabla 5. Correspondencia entre los nombres de los anticuerpos y sus estructuras

No. de anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera
SDP01375	SDP01346 VH1	/
SDP01376	SDP01346 VH2	/
SDP01377	SDP01346 VH3	/
SDP01378	SDP01346 VH4	/
SDP05576	SDP01346 VH4	/
SDP01365	SDP01315 VH1	SDP01315 VL1
SDP01366	SDP01315 VH2	SDP01315 VL1
SDP01367	SDP01315 VH3	SDP01315 VL1
SDP01368	SDP01315 VH1	SDP01315 VL2
SDP01369	SDP01315 VH2	SDP01315 VL2
SDP01370	SDP01315 VH3	SDP01315 VL2
SDP01371	SDP01315 VH1	SDP01315 VL3
SDP01372	SDP01315 VH2	SDP01315 VL3
SDP01373	SDP01315 VH3	SDP01315 VL3

A modo ilustrativo, a continuación se muestran las secuencias completas de SDP01378, SDP05576 y SDP01369.

> La secuencia completa de SDP01378

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWTGGR
 5 TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPGCRVHEYDYWGQG
 TLVTVSSGGGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 36)

> SDP05576

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWTGGR
 TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPGCRVHEYDYWGQG
 10 TLVTVSSAAASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
 73)

15 > La cadena pesada completa de SDP01369

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISSGGST
YYPDSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWGQGTITVTVSSAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK
 20 PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37)

> La cadena ligera completa de SDP01369

25 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASRYSGV
 PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPLTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 38)

30 A continuación, se evaluó mediante FACS la unión de anticuerpos monoclonales humanizados a células T γ9δ2.

Ensayo de afinidad tras la humanización del anticuerpo de dominio único SDP01346: La molécula de anticuerpo diluida en serie se incubó con 1×10^5 células T γ9δ2 a 4 °C durante 1 h, y se eliminó el exceso de anticuerpo mediante lavado. Se añadió el anticuerpo DyLight 405-AffiniPure de cabra anti-IgG de alpaca, dominio VHH (Jackson, # de cat. 128-475-232), y las
 35 células se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, las células se resuspendieron en 200 μL de un tampón PBS con un 2 % de FBS, y se midieron las señales de fluorescencia en la superficie celular utilizando un citómetro de flujo Thermo Attune NxT. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Ensayo de afinidad tras la humanización del anticuerpo quimérico de origen murino SDP01315: La molécula de anticuerpo diluida en serie se incubó con 1×10^5 células T $\gamma\delta 2$ a 4 °C durante 1 h, y se eliminó el exceso de anticuerpo mediante lavado. Se añadió el anticuerpo anti-Fc humano marcado con Alexa Flour 647 de origen murino (Jackson, # de cat. 209-605-098) y las células se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, las células se resuspendieron en 200 μ L de un tampón PBS con un 2 % de FBS, y las señales de fluorescencia en la superficie celular se midieron utilizando un citómetro de flujo Thermo Attune NxT. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Ensayos de afinidad de las moléculas humanizadas de SDP01346 y SDP01315

No. de anticuerpo	Unión a células T $\gamma\delta 2$	
	EC ₅₀ (nM)	MFI máx.
SDP01375	1.27	1093
SDP01376	0.70	1252
SDP01377	0.77	1237
SDP01378	1.06	1496
SDP01365	2.42	15519
SDP01366	2.11	14836
SDP01367	1.79	14698
SDP01368	1.67	14854
SDP01369	1.74	15014
SDP01370	2.00	14922
SDP01371	1.70	15385
SDP01372	1.69	15470
SDP01373	2.50	15678

Los resultados indican que SDP01378, una molécula humanizada del anticuerpo de dominio único, mostró la mayor afinidad, y que SDP01365-SDP01373, moléculas humanizadas de SDP01346, presentaban una afinidad comparable. Se seleccionó SDP01369, que contenía un número moderado de mutaciones inversas.

Ejemplo 6. Diseño y preparación de anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR

Para el extremo GPC3, se seleccionó el anticuerpo G con afinidad nanomolar. A continuación se muestran las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. El anticuerpo G se une a una subunidad C-terminal y no se une al GPC3 soluble.

> GPC3 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTG
DTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 39)

> GPC3 VL

DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSN
 RFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHPPTFGGQGTKLEIK (SEQ ID
 NO: 40)

Tabla 7. Las regiones VH y VL del anticuerpo G (según el esquema de numeración de Kabat)

5	No. de anticuerpo	Secuencias CDR		No. de secuencia
	Anticuerpo G	HCDR1	DYEMH	SEQ ID NO: 41
		HCDR2	ALDPKTGDTAYSQKFKG	SEQ ID NO: 42
		HCDR3	FYSYTY	SEQ ID NO: 43
		LCDR1	RSSQSLVHSNRNTYLH	SEQ ID NO: 44
10		LCDR2	KVSNRFS	SEQ ID NO: 45
		LCDR3	SQNTHPPT	SEQ ID NO: 46

Diseñamos una variedad de anticuerpos biespecíficos GPC3/ $\gamma\delta$ TCR y, finalmente, seleccionamos una estructura asimétrica 1+1 formada con SDP01346H4 (es decir, SDP01378), en la que se utilizó KIH (knob into hole) para evitar el emparejamiento erróneo de la cadena pesada, y una estructura asimétrica 2+1 formada con SDP01315H2L2, en la que se utilizó KIH para evitar el emparejamiento erróneo de la cadena pesada y HOT para evitar el emparejamiento erróneo de la cadena ligera. Las estructuras se muestran esquemáticamente en la FIG. 1.

Para prevenir y reducir el emparejamiento erróneo de las cadenas pesadas y ligeras, la Obscurin-O y la Titin-T utilizadas se describen en las SEQ ID NOs: 47-48, y el CH1 y el Ck se describen en las SEQ ID NOs: 49-50. Para prevenir y reducir el emparejamiento erróneo entre dos cadenas pesadas, se utilizaron mutaciones de IgG. Las secuencias completas de los anticuerpos biespecíficos se muestran a continuación. En las secuencias, las partes subrayadas son secuencias CDR, la parte subrayada con una línea ondulada es la secuencia de Obscurin-O o Titin-T, la parte subrayada con una línea punteada es el CH1 o Ck, las partes en cursiva son regiones Fc de IgG1, las partes en cursiva y negrita son mutaciones puntuales en las regiones Fc, y las partes en negrita son enlaces.

> Obscurin-O

SGAPRFLTRPKASVSVSGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGD
 LYRLKILDQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 47)

30 > Titina-T

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEGRFHIENTDDST
 TLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 48)

> CH1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 35 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID NO: 49)

> Ck

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
50)

> IgG1 Fc (WT)

5 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 51)

10 > IgG1 Fc1 (con mutaciones S354C/T366W/L234F/L235E)

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 52)

15 > IgG1 Fc2 (con mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V/L234F/L235E)

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGS
FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)

20 > SDP01716 H1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWTGGR
TTYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPGCRVHEYDYWGQG
TLVTVSS**AAAS**DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
25 SKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
54)

> SDP01716 H2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKGT
30 DTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY
35 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLVSKLTVD (SEQ ID NO: 55)

> SDP01716 L

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSN
RFSGVPDRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI

FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 56)

> SDP01696 H1

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISSGGST
 5 YYPDSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWGQGTTVTVSSGGG
GSSGAPRFLTRPKASVSVSGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYR
LKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGQVDAEADKTHTCPPCPAPEFEGGSPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGF
 10 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 57)

> SDP01696 L1

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSKV
PSRFGSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNFPLTFGGGTKLEIKGGGGSGIPPKIECLPI
 15 DISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGG
YTLTLRNEFGSDSATVNIHRSI (SEQ ID NO: 58)

> SDP01696 H2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTG
DTAYSQKFGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSSASTK
 20 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPEFEGGSPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
 25 YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 59)

> SDP01696 L2

Igual que SDP01716 L (SEQ ID NO: 56).

> SDP01704 H1

Igual que SDP01696 H1 (SEQ ID NO: 57).

30 > SDP01704 L1

Igual que SDP01696 L1 (SEQ ID NO: 58).

> SDP01704 H2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTG
DTAYSQKFGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSSASTK
 35 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKP
GASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFGRVTLTADKS
TSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA

ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 5 KTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 60)

> SDP01704 L2

DVVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSN
 RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
 10 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 61)

Las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos se clonaron en vectores
 pTT5 y, a continuación, se transfectaron células ExpiCHO con los vectores. Tras 8 días, se
 retiraron las células mediante centrifugación y se recogió y filtró la solución de cultivo celular. La
 15 solución de cultivo celular recogida se purificó utilizando una columna de afinidad de proteína A
 (MabSelect SuRe, GE), y los anticuerpos unidos se eluyeron con glicina. Los eluidos se
 neutralizaron con Tris 1 M y, a continuación, se desalaron. Según el análisis, se obtuvieron los
 anticuerpos diana SDP01716, SDP01696 y SDP01704.

20 **Ejemplo 7. Medición de la afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos anti- GPC3/γδTCR para antígenos humanos y de mono**

Se utilizó un chip biosensor de proteína A (# de cat. 29139121-AB, Cytiva). Cada
 anticuerpo de ensayo se disolvió en una solución tampón HBS-EP+ como ligando y fue capturado
 por la proteína A en los canales del chip. Se utilizaron como analitos el GPC3 humano (Sino
 Biological, # de cat. 10088-H08H), el GPC3 de macaco cynomolgus (Acrobiosystems, # de cat.
 25 GP3-C5225) y los antígenos γ9δ2 humano y γ9δ2 de macaco cynomolgus, que se disolvieron en
 una solución tampón HBS-EP+, y el analito se diluyó en serie al doble. Se dejó que el antígeno
 diluido fluyera a través de los canales experimental y de referencia a un caudal de 30 µL/min
 (asociación: 80 segundos; disociación: 300 segundos). Se seleccionó glicina 10 mM pH 1.5 (GE
 Healthcare, BR-1003-54) como tampón de regeneración y se dejó fluir a un caudal de 10 µL/min
 30 durante 30 segundos. Los datos se analizaron utilizando el software de evaluación Biacore 8K.

Los resultados se muestran en las Tablas 8 y 9. La afinidad de unión al antígeno de los
 tres anticuerpos por las proteínas GPC3 humanas y del mono cinomolgo fue de
 aproximadamente 2 nM, lo que fue similar a la afinidad del anticuerpo G. Los valores de K_D de
 unión de los tres anticuerpos a la proteína TCR γ9δ2 del mono cinomolgo fueron de
 35 aproximadamente 50 nM.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la unión de los anticuerpos a la proteína GPC3 humana/del
 mono cinomolgo

No. de anticuerpo	Antígeno	k_a (1/ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
-------------------	----------	--------------	-------------	-----------

SDP01716	GPC3 humano	1.47E+05	2.42E-04	1.65E-09
SDP01696		1.42E+05	2.47E-04	1.74E-09
SDP01704		1.36E+05	2.50E-04	1.84E-09
SDP01716	Mono cynomolgus GPC3	1.87E+05	2.75E-04	1.47E-09
SDP01696		1.96E+05	2.88E-04	1.47E-09
SDP01704		1.78E+05	2.89E-04	1.63E-09

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la unión de los anticuerpos a la proteína $\gamma\delta 2$ humana/del mono cinomolgo

No. de anticuerpo	Antígeno	k_a (1/ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SDP01716	Humano $\gamma\delta 2$	4.26E+05	4.27E-04	1.00E-09
SDP01696		2.54E+04	1.03E-03	4.06E-08
SDP01704		2.67E+04	1.02E-03	3.83E-08
SDP01716	Mono cynomolgus $\gamma\delta 2$	1.99E+05	1.37E-02	6.88E-08
SDP01696		1.40E+05	5.92E-03	4.24E-08
SDP01704		1.48E+05	6.01E-03	4.06E-08

Ejemplo 8. Medición de la actividad de unión de anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR a células GPC3-positivas y células T $\gamma\delta 2$ humanas

Se midió la actividad de unión de los anticuerpos biespecíficos $\gamma\delta$ T a células HepG2 que expresan de forma natural GPC3 humano en niveles elevados (adquiridas a ATCC) y a células DLD-1 que no expresan GPC3 humano (adquiridas a ATCC) mediante un ensayo FACS. En el ensayo para medir la actividad de unión a GPC3 de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR en las células, se detectaron las señales de fluorescencia de los anticuerpos que se unieron a la superficie celular, y se evaluó la fuerza de unión de los anticuerpos según la intensidad de las señales de fluorescencia. Concretamente, la molécula de anticuerpo diluida en serie y la molécula de control se incubaron con 1×10^5 células a 4 °C durante 1 h, y se eliminó el exceso de anticuerpo mediante lavado. Se añadió el anticuerpo anti-Fc humano marcado con Alexa Flour 647 de origen murino (Jackson, # de cat. 209-605-098) y se incubaron las células a 4 °C durante 30 minutos. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, las células se resuspendieron en 200 μ L de un tampón PBS con un 2 % de FBS, y las señales de fluorescencia en la superficie celular se midieron utilizando un citómetro de flujo Thermo Attune NxT. Las células utilizadas fueron células de la línea celular HepG2.

La actividad de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR a las células T $\gamma\delta 2$ humanas y su actividad de unión a las PBMC humanas se midieron mediante un ensayo FACS. Las células T $\gamma\delta 2$ humanas se obtuvieron mediante inducción con ácido zoledrónico e IL-2. En el ensayo para medir la actividad de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR en las células T $\gamma\delta$, se detectaron las señales de fluorescencia de los anticuerpos que se unieron a la superficie celular, y se evaluó la fuerza de unión de los anticuerpos según la intensidad de las señales de fluorescencia. Concretamente, la molécula de anticuerpo diluida en serie y la molécula de control se incubaron con 1×10^5 células a 4 °C durante 1 h, y se eliminó el

exceso de anticuerpo mediante lavado. Se añadió el anticuerpo anti-Fc humano marcado con Alexa Flour 647 de origen murino (Jackson, # de cat. 209-605-098) y las células se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, las células se resuspendieron en 200 µL de un tampón PBS con un 2 % de FBS, y las señales de fluorescencia en la superficie celular se midieron utilizando un citómetro de flujo Thermo Attune NxT.

Los resultados se muestran en las figuras 2A-2D. Como se muestra en las figuras 2A y 2B, los extremos GPC3 de SDP01716 y SDP01696 eran comparables en cuanto a afinidad, con valores de EC_{50} de 4.853 nM y 5.166 nM, respectivamente. El SDP01704 mostró características de unión bivalente, y su valor EC_{50} fue de 2.466 nM; ninguno de los anticuerpos analizados mostró unión inespecífica en células GPC3 negativas. Como se muestra en las figuras 2C y 2D, la afinidad de SDP01716 por las células T $\gamma\delta$ fue de 0,9064 nM, la de SDP01696 fue de 2.676 nM y la de SDP01704 fue de 4.289 nM; ninguno de los anticuerpos analizados mostró unión no específica en las PBMC.

Ejemplo 9. Efectos de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR sobre las señales naturales de BTN2A/BTN3A-TCR

En estado natural, los antígenos fosforilados en las células alteran la tensión molecular de BTN3A tras unirse a BTN3A; dos moléculas de BTN3A y dos moléculas de BTN2A se unen para formar un heterotetrámero, y el heterotetrámero interactúa con los TCR, activa los TCR e induce la activación, proliferación, lisis y otras funciones de las células T $\gamma\delta$. Dado que los anticuerpos anti- $\gamma\delta$ TCR también se unen a los TCR, en este ejemplo se evaluaron los efectos de los anticuerpos de la presente divulgación sobre las señales naturales BTN2A/BTN3A-TCR. El SDP01378 era una molécula monovalente del extremo $\gamma\delta$ T del SDP01716, y el SDP01315 era una molécula monovalente del SDP01696 y del SDP01704.

El medio de cultivo de las células A375-Luc era RPMI1640 con un 10 % de suero fetal bovino inactivado. Las células T $\gamma\delta$ se obtuvieron mediante la expansión de PBMC. Se ajustó la densidad de las células A375-Luc y se sembraron en una placa de 96 pocillos a razón de 25 µL/pocillo (1 x 10⁴ células/pocillo). Las células T $\gamma\delta$ (25 µL/pocillo, 1 x 10⁵ células/pocillo) se mezclaron con las células A375-Luc. A continuación, se añadió SDP01378 o SDP01315 (concentración final: 10 nM) a razón de 25 µL/pocillo, y se añadió un anticuerpo agonista de BTN3A diluido en serie a razón de 25 µL/pocillo. La placa se incubó en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante 24 h. Tras 24 h, se añadió el reactivo del sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (Promega, E2650) a razón de 100 µL/pocillo para la detección. Consulte las instrucciones del reactivo para conocer los procedimientos específicos.

Los resultados se muestran en las figuras 3A y 3B. Ni el SDP01378 ni el SDP01315 bloquearon las señales naturales de BTN2A/BTN3A-TCR. Por lo tanto, puede considerarse que los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR de la presente divulgación no bloquearon las señales naturales de BTN2A/BTN3A-TCR.

Ejemplo 10. Medición de la actividad de destrucción *in vitro* mediada por el anticuerpo biespecífico anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR de las células T $\gamma\delta$ contra células tumorales

En este ejemplo, se evaluó la actividad de destrucción mediada por anticuerpos de las células T $\gamma\delta$ contra células diana con diferentes niveles de expresión de GPC3 mediante un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH).

Las células HepG2 expresan de forma natural GPC3 en niveles elevados, y el medio de cultivo celular fue DMEM (Gibco, # de cat. 11995-065, lo mismo se aplica en lo sucesivo) que contenía un 15 % de suero fetal bovino inactivado. Las células Huh-7 expresan GPC3 en niveles moderados, y el medio de cultivo celular fue DMEM. Las células MKN-45 expresan GPC3 en niveles bajos, y el medio de cultivo celular fue RPMI 1640 (Gibco, # de cat. 10491A-01; lo mismo se aplica en lo sucesivo). Las células DLD-1 no expresan GPC3, y el medio de cultivo celular fue RPMI 1640. Las células diana se digirieron y luego se resuspendieron en un medio de cultivo RPMI 1640 que contenía un 2 % de suero, y la densidad se ajustó a 7×10^4 células/mL. Posteriormente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 50 μ L/pocillo, y se añadieron los anticuerpos de ensayo (diluidos en serie, 50 μ L). Se añadieron 50 μ L adicionales de medio de cultivo a cada pocillo. Se recogieron las células T $\gamma\delta$ y se resuspendieron en RPMI 1640 que contenía un 2 % de suero fetal bovino, y se ajustó la densidad celular. Las células se sembraron en las placas de ensayo mencionadas anteriormente a razón de 50 μ L por pocillo, y las placas se incubaron en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante 24 h. Se retiraron las placas de cultivo celular y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, y se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se analizaron los niveles de LDH utilizando un kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, G1780). Consulte las instrucciones del reactivo para conocer los procedimientos específicos.

Los resultados se muestran en las figuras 4A a 4D y en la tabla 10. La actividad citotóxica de los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación contra las células tumorales se debilitó a medida que disminuía el nivel de expresión del antígeno. La afinidad de los extremos $\gamma\delta$ T de los anticuerpos se correlacionó positivamente con la actividad citotóxica contra las células tumorales, y las moléculas bivalentes del extremo GPC3 fueron superiores a las moléculas monovalentes.

Tabla 10. Destrucción de células con diferentes niveles de expresión de antígeno por anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR

No. de anticuerpo	Actividad citotóxica $\gamma\delta$ T (EC ₅₀ , nM)							
	HepG2		Huh-7		MKN-45		DLD-1	
	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}
SDP01716	0.01	70.3 %	0.06	93.8 %	0.004	10.3 %	-	-
SDP01696	0.06	70.1 %	0.21	50.9 %	0.024	11.0 %	-	-
SDP01704	0.03	72.0 %	0.11	61.7 %	0.016	6.6 %	-	-
hIgG1	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: - significa que no se detectó actividad citotóxica.

Ejemplo 11. Efecto de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR sobre la actividad citotóxica de las células T $\gamma\delta$ derivadas de diferentes donantes de PBMC

En este ejemplo, se evaluó la actividad de destrucción mediada por anticuerpos de las células T $\gamma\delta$ contra células diana que expresan GPC3 mediante un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH).

Las células HepG2 se digirieron y luego se resuspendieron en un medio de cultivo RPMI1640 que contenía un 2 % de suero, y la densidad celular se ajustó a 7×10^4 células/mL. Posteriormente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 50 μ L/pocillo, y se añadieron los anticuerpos de ensayo (diluidos en serie, 50 μ L). Se añadieron 50 μ L adicionales de medio de cultivo a cada pocillo. Se recogieron células T $\gamma\delta$ expandidas de diferentes donantes y se resuspendieron en RPMI1640 que contenía un 2 % de suero fetal bovino, y se ajustó la densidad celular. Las células se sembraron en las placas de ensayo mencionadas anteriormente a 50 μ L/pocillo, y las placas se incubaron en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO_2 durante 24 h. Se retiraron las placas de cultivo celular y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos; a continuación, se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular y se analizaron los niveles de LDH utilizando un kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, G1780).

Se muestran a modo ilustrativo los resultados para el SDP01716. Los resultados se muestran en las figuras 5A a 5D y en la tabla 11. El SDP01716 pudo mediar la destrucción de células tumorales por parte de células T $\gamma\delta$ procedentes de diferentes donantes, sin diferencias relativamente significativas en los valores de EC_{50} y de destrucción máxima.

Tabla 11. Actividad de destrucción mediada por anticuerpos de las células T $\gamma\delta$ derivadas de diferentes donantes contra HepG2

No. de anticuerpo	Actividad de destrucción contra HepG2 (EC_{50} , nM)							
	#SC12004		#SC12392		#XC11053		#XC11061	
	EC_{50}	E _{max}	EC_{50}	E _{max}	EC_{50}	E _{max}	EC_{50}	E _{max}
SDP01716	0.038	60.30 %	0.033	68.23 %	0.017	46.94 %	0.054	44.95 %
hlgG1	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: #SC12004, #SC12392, #XC11053 y #XC11061 eran células T $\gamma\delta$ expandidas derivadas de diferentes donantes (sangre periférica humana alogénica sana), y - significa que no se detectó actividad citotóxica.

Ejemplo 12. Medición de la actividad lítica de anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR contra células con baja expresión de antígeno en diferentes relaciones efector-objetivo

En este ejemplo, se evaluó la actividad de destrucción mediada por anticuerpos de las células T $\gamma\delta$ contra células diana que expresan GPC3 en niveles bajos mediante un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH).

Las células MKN-45 expresan de forma natural GPC3 en niveles bajos. Las células MKN-45 se digirieron y luego se resuspendieron en un medio de cultivo RPMI1640 que contenía un 2 % de suero, y la densidad celular se ajustó a 7×10^4 células/mL. Posteriormente, las células se

sembraron en placas de 96 pocillos a 50 μ L/pocillo, y se añadieron los anticuerpos de ensayo (diluidos en serie, 50 μ L). Se añadieron 50 μ L adicionales de medio de cultivo a cada pocillo. Se recogieron las células T $\gamma\delta$ y se resuspendieron en RPMI1640 que contenía un 2 % de suero fetal bovino, y se ajustó la densidad celular. Las células se sembraron en las placas de ensayo mencionadas anteriormente a 50 μ L/pocillo, con unas proporciones finales de efectoras a dianas (células T $\gamma\delta$:células MKN-45) de 1:1, 10:1 y 30:1. La placa se incubó en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante 24 h. Se retiraron las placas de cultivo celular y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos; a continuación, se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular y se analizaron los niveles de LDH utilizando un kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, G1780). Consulte las instrucciones del reactivo para conocer los procedimientos específicos.

Se muestran a modo ilustrativo los resultados para el SDP01716. Como se muestra en la FIG. 6A, cuando la relación efector-objetivo era de 1:1, la actividad lítica del SDP01716 contra células con baja expresión de antígeno era débil, con un valor de lisis máximo del 17 %. Como se muestra en la FIG. 6B, tras aumentar la relación efector-blanco a 10:1, el SDP01716 pudo potenciar la actividad citotóxica contra células con baja expresión de antígeno, alcanzando el valor máximo de citotoxicidad el 64 %. Como se muestra en la FIG. 6C, cuando la relación efector-blanco se incrementó a 30:1, se alcanzó casi el 100 % de destrucción. Es decir, los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR de la presente divulgación podían destruir las células tumorales diana de forma dependiente de la relación efector-blanco.

Ejemplo 13. Aumento de la proporción de células T $\gamma\delta$ en las PBMC para potenciar la actividad letal de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR y medición de la liberación de citocinas

En este ejemplo, se evaluó la actividad de destrucción mediada por anticuerpos de las células T $\gamma\delta$ contra células diana que expresan GPC3 mediante un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH).

Las células HepG2 expresan de forma natural GPC3 en niveles elevados. Las células HepG2 se digirieron y luego se resuspendieron en un medio de cultivo RPMI1640 que contenía un 2 % de suero, y la densidad celular se ajustó a 7×10^4 células/mL. Posteriormente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 50 μ L/pocillo, y se añadieron los anticuerpos de ensayo (diluidos en serie, 50 μ L). Se añadieron 50 μ L adicionales de medio de cultivo a cada pocillo. Se recogieron PBMC y se resuspendieron en RPMI1640 con un 2 % de suero fetal bovino, y se ajustó la densidad celular. Las células se sembraron en las placas de ensayo mencionadas anteriormente a 50 μ L/pocillo; o bien se añadieron un 30 % de células T $\gamma\delta$ a las PBMC, y las células se sembraron en las placas de ensayo mencionadas anteriormente a 50 μ L/pocillo. Las placas se incubaron en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante 24 h. Las placas de cultivo celular se retiraron y se centrifugaron a 400 g durante 5 min, y se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se analizaron para determinar los niveles de LDH utilizando

un kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, G1780). Mientras tanto, se utilizaron un kit de ensayo de IFN γ (Cisbio, S62HIFNGPEG) y un kit de ensayo de TNF α (Cisbio, 62HTNFAPEH) para determinar los niveles de secreción de las citocinas correspondientes. Consulte las instrucciones de los reactivos para conocer los procedimientos específicos.

Se muestran a modo ilustrativo los resultados para SDP01716. Los resultados se muestran en las FIGS. 7A a 7D. La FIG. 7A muestra la actividad citotóxica de las PBMC del donante NOs XC11053, y la FIG. 7B muestra la actividad citotóxica tras la adición de un 30 % de células T $\gamma\delta$ a las PBMC del donante NOs XC11053. La FIG. 7C muestra la destrucción por parte de las PBMC del donante NOs SC12392, y la FIG. 7D muestra la actividad destructora tras la adición de un 30 % de células T $\gamma\delta$ a las PBMC del donante NOs SC12392.

Las FIGS. 7A y 7C indican que la capacidad de SDP01716 para destruir células tumorales en un sistema de PBMC puras fue menor que la de BMK-029 (ERY974 en US20220348658), que es un anticuerpo biespecífico contra CD3 dirigido contra el mismo objetivo, ya que el anticuerpo biespecífico contra CD3 puede activar más células T como células efectoras para destruir tumores. Las figuras 7B y 7D indican que el aumento de la proporción de células T $\gamma\delta$ en las PBMC puede mejorar su actividad destructora. Por otra parte, los resultados de la liberación de citocinas correspondientes a las figuras 7A a 7D se muestran en las figuras 8A a 8D. El SDP01716 indujo una menor liberación de IFN γ y TNF α al destruir las células tumorales.

Ejemplo 14. Medición de la actividad promotora de la proliferación de células T $\gamma\delta$ de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR en PBMC

En este ejemplo, se evaluó mediante citometría de flujo la actividad inductora de la proliferación de células T $\gamma\delta$ de los anticuerpos biespecíficos anti-GPC3/ $\gamma\delta$ TCR en PBMC.

Se añadieron PBMC (800 μ L, 1×10^6 células) a una placa de 24 pocillos. Las células HepG2 se lavaron dos veces con PBS y, a continuación, se ajustó la densidad celular a 5×10^5 células/mL. Se añadió 1 mL de la suspensión celular al pocillo correspondiente. Se prepararon soluciones de los anticuerpos de ensayo con la concentración correspondiente utilizando el medio de cultivo, y a continuación se añadieron 200 μ L de cada solución a un pocillo. La placa se incubó en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO $_2$ y el medio de cultivo se renovó cada 3 días. Tras 6-7 días, las células se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con un anticuerpo CD3 (BD, # de cat. 564713), un anticuerpo TCR V δ 2 (BD, # de cat. 555739) y un anticuerpo TCR V γ 9 (BD, # de cat. 555732), y se identificaron los cambios en la proporción de células T $\gamma\delta$.

Los resultados se muestran en la FIG. 9. En las PBMC derivadas de tres donantes: #XC11211, #XC11061 y #XC11251, tras 6-7 días de estimulación, SDP01716, SDP01696 y SDP01704 pudieron aumentar significativamente la proporción de células T $\gamma\delta$.

Ejemplo 15. Validación mediante un modelo de tumor de xenoinjerto de cáncer de hígado humano Huh-7 en ratones

1. Se inocularon células de cáncer de hígado humano Huh-7 (Banco de Células de la Academia China de Ciencias) por vía subcutánea en ratones NSG (hembras, de 6-8 semanas de edad, suministrados por Vital River) a una concentración de 5×10^6 células/100 μ L/ratón, y los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 7 (G1-G4). Las células tumorales se inocularon el día de la agrupación, y se infundieron simultáneamente células T $\gamma\delta$ y un fármaco. Los grupos recibieron las dosis según los siguientes regímenes:

G1: medio G2: células T $\gamma\delta$ + PBS

G3: células T $\gamma\delta$ + SDP01716 (3 mg/kg)

G4: células T $\gamma\delta$ + SDP01716 (0.3 mg/kg)

A partir de entonces, se infundieron células T $\gamma\delta$ y se administró el fármaco una vez a la semana. Durante los periodos de administración y observación, se midió el volumen tumoral dos veces por semana y se registraron las mediciones. Las fórmulas de cálculo se muestran a continuación (lo mismo se aplica en lo sucesivo):

El volumen tumoral (TV) se calculó utilizando la fórmula $TV = 1/2 \times a \times b^2$, donde a y b representan los diámetros largo y corto del tumor medido, respectivamente.

La tasa de proliferación tumoral relativa $T/C\% = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$.

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral $TGI\% = 1 - T/C\%$.

Los resultados se muestran en las figuras 10A y 10B y en la tabla 12. El grupo de monoterapia con células T $\gamma\delta$ (G2) presentó una TGI del 11 %; el efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral fue limitado. El SDP01716 pudo inhibir el crecimiento tumoral de forma dependiente de la dosis, alcanzando el TGI un 58 % a una dosis de 3 mpk, y no se observó ningún efecto significativo sobre el peso corporal de los ratones en ninguno de los grupos de tratamiento.

Tabla 12. Actividad antitumoral de SDP01716 en un modelo de tumor de xenoinjerto Huh-7

Grupo	Inoculación de células T $\gamma\delta$	Fármaco de prueba	Dosis de administración	Vía/frecuencia de administración	Volumen tumoral (mm^3)	TGI (%)
G1	PBS	PBS	/	ip, qw	536.6 ± 60	-
G2	1E7 células T $\gamma\delta$ /inyección, iv, qw	PBS	/		472.1 ± 78	11
G3		SDP01716	3 mpk		238.4 ± 29	58**
G4		SDP01716	0.3 mpk		302.2 ± 32	45*

Nota: * representa $P < 0,05$, y ** representa $P < 0,01$.

2. Se inocularon células Huh-7 por vía subcutánea en ratones NSG (hembras, de 6-8 semanas de edad, suministrados por GemPharmatech) a una concentración de 5×10^6 células/100 μ L/ratón, y los ratones se dividieron aleatoriamente en 6 grupos de 7. Las células tumorales se inocularon el día de la agrupación, y se infundieron simultáneamente células T $\gamma\delta$ y un fármaco. Los grupos recibieron las dosis según los siguientes regímenes:

G1: Medio

G2: Células T $\gamma\delta$

G3: células T $\gamma\delta$ + SDP01716 (3 mg/kg)

G4: células T $\gamma\delta$ + SDP01696 (3.9 mg/kg)

G5: células T $\gamma\delta$ + SDP01704 (5.1 mg/kg).

A continuación, se infundieron células T $\gamma\delta$ y se administró el fármaco una vez a la semana; si se utilizaban células T $\gamma\delta$ en combinación con un anticuerpo, se administraban simultáneamente. Durante los periodos de administración y observación, se midió el volumen tumoral dos veces por semana y se registraron las mediciones.

Los resultados se muestran en las figuras 11A y 11B y en la tabla 13. Todos los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación pudieron inhibir eficazmente los tumores, y no se observó ningún cambio significativo en el peso corporal de los ratones en cada grupo de tratamiento.

Tabla 13. Actividad antitumoral de los anticuerpos biespecíficos en un modelo de tumor de xenoinjerto Huh-7

Grupo	Inoculación de células T $\gamma\delta$	Fármaco de prueba	Dosis de administración	Vía/frecuencia de administración	Volumen tumoral (mm ³)	TGI (%)
G1	PBS	PBS	/	ip, qw	576.7 $\pm$ 89	-
G2	1E7 células T $\gamma\delta$ /inyección, iv, qw	PBS	/		579.0 $\pm$ 79	-3
G3		SDP01716	3 mpk		149.2 $\pm$ 57	74**
G4		SDP01696	3.9 mpk		296.5 $\pm$ 60	49
G5		SDP01704	5.1 mpk		217.6 $\pm$ 69	64**

Nota: ** representa $P < 0,01$.