

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 602**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/42** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2017** **PCT/US2017/053790**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2018** **WO18064205**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2017** **E 17857353 (1)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024** **EP 3518972**

54 Título: **Moléculas de unión a antígeno y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**28.09.2016 US 201662401007 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.04.2025**

73 Titular/es:

**KITE PHARMA INC. (100.00%)**  
**2400 Broadway**  
**Santa Monica, CA 90404, US**

72 Inventor/es:

**WILTZIUS, JED, J., W. y**  
**SIEVERS, STUART, A.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 013 602 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Moléculas de unión a antígeno y métodos de uso de las mismas

**5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS****CAMPO DE LA INVENCIÓN**

10 Esta divulgación se refiere a moléculas de unión a antígeno, como anticuerpos, que se unen específicamente al scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden estas secuencias y células que presentan dichas moléculas, polinucleótidos que codifican dichas moléculas de unión a antígeno, así como formas humanizadas de las moléculas de unión a antígeno; también se divulgan métodos de uso de las moléculas de unión a antígeno.

**15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

15 Las moléculas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos, y fragmentos como Fabs, F(ab')<sub>2</sub>, scFvs, etc., se usan en inmunoterapia y en aplicaciones basadas en fase sólida como biosensores, cromatografía de afinidad e inmunoensayos. Estos anticuerpos y otras moléculas de unión a antígeno adquieren su utilidad en virtud de su capacidad para unirse específicamente a sus dianas. Los anticuerpos antiidiotípicos son un subconjunto de anticuerpos, y son anticuerpos generados contra anticuerpos inmunizantes. Estos anticuerpos antiidiotípicos demostraron una unión específica contra los idiotipos (determinantes antigénicos únicos en la superficie de los anticuerpos) de los anticuerpos inmunizantes. Los anticuerpos antiidiotípicos pueden clasificarse generalmente en tres grupos distintos: (1) anticuerpos que reconocen idiotipos distintos del sitio de unión al antígeno (ABS) en los anticuerpos inmunizantes; (2) anticuerpos que reconocen epítopos dentro del ABS e imitan la estructura, y forman la denominada "imagen interna", del antígeno nominal; y (3) anticuerpos que reconocen epítopos dentro del ABS sin el parecido estructural del antígeno nominal (véase, por ejemplo, Pan et al., (1995) FASEB J 9:43-49).

30 FMC63 es un anticuerpo monoclonal de IgG2a de ratón que reconoce CD19, que se expresa en la superficie de células B (Zola et al., (1991) Immunol Cell Biol 69:411-22). Los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) formados a partir de FMC63 constituyen el componente de direccionamiento de algunos receptores de antígenos quiméricos (CAR) (Kochenderfer et al., (2009) J Immunother 32(7):689-702), y el scFv de FMC63 se ha usado con anterioridad para generar anticuerpos anti-FMC63 (véase, por ejemplo, el documento WO2014/190273 y Jena et al., (2013) PLoS ONE 8(3):e57838).

35 En la presente se divulgan moléculas de unión a antígeno de conejo, incluyendo anticuerpos, que se unen específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), así como moléculas que comprenden estas secuencias y células que presentan tales moléculas. Las formas humanizadas de las moléculas de unión a antígeno de conejo divulgadas también constituyen un aspecto de la divulgación. También se divulgan aplicaciones y usos de estas moléculas de unión a antígeno.

**40 SUMARIO DE LA INVENCIÓN REIVINDICADA**

45 La presente invención se refiere a una molécula de unión a antígeno aislada que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 de una molécula que comprende dicha secuencia de aminoácidos, en donde la molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL)" dicha VH comprende una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 y una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; y dicha VL que comprende una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29, una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

55 En una realización, la molécula de unión a antígeno de la presente invención comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 21.

En una realización, la molécula de unión a antígeno de la presente invención comprende una secuencia de región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 27.

60 En una realización, la molécula de unión a antígeno de la presente invención comprende además un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocromático, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, una radiomarcador y un hapteno.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno de la presente invención.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la presente invención.

La presente invención también se refiere a una célula que comprende el polinucleótido de la presente invención o el vector de la presente invención.

Por último, la presente invención también se refiere a una composición que comprende la molécula de unión a antígeno de la presente invención, polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno de la presente invención, o células que comprenden polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno de la presente invención.

## ENSEÑANZA GENERAL

La presente invención se define en los términos de las reivindicaciones adjuntas. Se pretende que las siguientes explicaciones expliquen el concepto general de la enseñanza y sus varios aspectos y realizaciones. La enseñanza general describe aspectos que en algunos aspectos van más allá de la invención reivindicada como tal, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. La enseñanza general se proporciona para situar la invención real en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. La información técnica adicional que no entra en el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención. En particular, no debe interpretarse que los términos "realización", "invención" y "aspecto" se refieren necesariamente a la invención reivindicada, a menos que la materia en cuestión esté comprendida en el alcance de las reivindicaciones.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno aislada que se une específicamente a una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno se une específicamente a una molécula que comprende uno o más péptidos (por ejemplo, regiones determinantes de la complementariedad (CDR)) seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO:74-82. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un scFv, un Fab, un Fab', un Fv, un F(ab')<sub>2</sub>, un dAb, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo de IgE, un anticuerpo de IgD, un anticuerpo de IgM, un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG1 que tenga por lo menos una mutación en la región bisagra, un anticuerpo de IgG2, un anticuerpo de IgG2 que tenga por lo menos una mutación en la región bisagra, un anticuerpo de IgG3, un anticuerpo de IgG3 que tenga por lo menos una mutación en la región bisagra, un anticuerpo de IgG4, un anticuerpo de IgG4 que tenga por lo menos una mutación en la región bisagra, un anticuerpo que comprenda por lo menos un aminoácido de origen no natural, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno comprende una cadena pesada (HC) y en realizaciones adicionales la HC comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (VH) seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 15, 21, 33, 39 y 51. En otras realizaciones más, la región variable (VH) de la molécula de unión a antígeno comprende una o más de (a) una CDR1, (b) una CDR2 y (c) una CDR3. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 23, 41 y 53. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 24, 42 y 54. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 25, 43 y 55. En realizaciones adicionales, la molécula de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada y una CDR3 de cadena pesada, cada CDR comprendiendo una secuencia de aminoácidos mostrada en las FIGURAS 5-21. En otras realizaciones más, una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos VH que es por lo menos aproximadamente un 70%, por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 80%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 96%, por lo menos aproximadamente un 97%, por lo menos aproximadamente un 98%, por lo menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% idéntica a una VH de una molécula de unión a antígeno proporcionada en la presente.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno comprende una cadena ligera (LC) y en realizaciones adicionales la LC comprende una secuencia de región variable de cadena ligera (VL) seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 18, 27, 36, 45 y 57. En realizaciones adicionales, la región variable (VL) comprende una o más de (a) una CDR1, (b) una CDR2, y (c) una CDR3. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 29, 47 y 59. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno comprende una CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, 30, 48 y 60. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno comprende una CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 31, 49 y 61. En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera y una CDR3 de cadena ligera, cada CDR comprendiendo una secuencia de aminoácidos mostrada en una de las FIGURAS 5-21. En otras realizaciones más, una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia de

aminoácidos VL que es por lo menos aproximadamente un 70%, por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 80%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 96%, por lo menos aproximadamente un 97%, por lo menos aproximadamente un 98%, por lo menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% idéntica a una VL de una molécula de unión a antígeno proporcionada en la presente.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y (b) una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende: (a) una región CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; (b) una región CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (c) una región CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; (d) una región CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; (e) una región CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; y (f) una región CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (b) una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una región CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; (b) una región CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (c) una región CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; (d) una región CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; (e) una región CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; y (f) una región CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; y (b) una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27. En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una región CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; (b) una región CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; (c) una región CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (d) una región CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; (e) una región CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30; y (f) una región CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; y (b) una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una región CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; (b) una región CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; (c) una región CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (d) una región CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; (e) una región CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30; y (f) una región CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39; y (b) una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una región CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41; (b) una región CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; (c) una región CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; (d) una región CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47; (e) una región CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48; y (f) una región CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49.

En una realización específica, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51; y (b) una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57. En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno comprende (a) una región CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; (b) una región CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54; (c) una región CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55; (d) una región CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59; (e) una región CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60; y (f) una región CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61.

En varias realizaciones, una molécula de unión a antígeno proporcionada en la presente comprende además un marcador detectable, y puede seleccionarse del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocromático, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, una radiomarcador y un hapteno. En varias realizaciones, un marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja



Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofococianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry.

En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente. También se proporciona un polinucleótido que codifica la cadena pesada de una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y un polinucleótido que codifica la cadena ligera de una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente. También se divulga un vector que comprende los polinucleótidos. Además, se divulga una célula que comprende uno o más de tales vectores. En varias realizaciones, la célula comprende una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula CHO, una célula Sp2/0, una célula de conejo y una célula de *E. coli*. Se proporciona un método para elaborar una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente que comprende incubar una célula divulgada en la presente en condiciones adecuadas.

Cualquier referencia a un método de tratamiento o diagnóstico llevado a cabo en el cuerpo humano o animal debe interpretarse como sustancias y composiciones para su uso en tales métodos. En otro aspecto, se proporciona un método para administrar una dosis de un medicamento a un sujeto, la dosis comprendiendo un número preseleccionado de células que presentan una molécula terapéutica que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una muestra de volumen conocido que comprende una población que comprende un número conocido de células, de las que se sabe o se sospecha que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1; (b) proporcionar una alícuota de la muestra que comprende una población de células que presentan una molécula terapéutica que comprende la SEQ ID NO: 1; (c) proporcionar una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1, la molécula de unión a antígeno comprendiendo además un marcador detectable; (d) poner en contacto la alícuota de (b) con la molécula de unión a antígeno de (c) en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión que comprenda una célula presente en la muestra y la molécula de unión a antígeno; (e) determinar la fracción de células presentes en un complejo de unión de (d) en la alícuota; (f) determinar la concentración de células que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 en la muestra, basándose en la fracción de células determinada en (e); (g) determinar el volumen de la muestra que comprende el número seleccionado de células; y (h) administrar el volumen de la muestra determinado en (g) al sujeto.

En algunas realizaciones del método, (a) la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es un CAR; y (b) la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+, células T CD4+, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células T NK. En otra realización, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, Muerte Programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En una realización adicional, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocrómico, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En realizaciones adicionales, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofococianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry,

TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRed1, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es una célula T y, en más realizaciones adicionales, la célula T se dispone *in vitro* o la célula T se dispone *in vivo*. En otras realizaciones, la célula T se encuentra en uno de sangre, tejido extraído, tejido cultivado *ex vivo* y medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T autóloga, y en otras realizaciones la célula T es una célula T alogénica. En una realización, la dosis es de  $1,0 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un método de administración de una dosis de un medicamento a un sujeto, la dosis comprendiendo una cantidad preseleccionada de células que presentan una molécula terapéutica que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82. En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una muestra de volumen conocido que comprende una población que comprende una cantidad conocida de células, células que se sabe o se sospecha que presentan una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82; (b) proporcionar una alícuota de la muestra que comprende una población de células que presentan una molécula terapéutica que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO 74-82; (c) proporcionar una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82, la molécula de unión a antígeno comprendiendo además un marcador detectable; (d) poner en contacto la alícuota de (b) con la molécula de unión a antígeno de (c) en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión que comprenda una célula presente en la muestra y la molécula de unión a antígeno; (e) determinar la fracción de células presentes en un complejo de unión de (d) en la alícuota; (f) determinar la concentración de células que presentan una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 en la muestra, basándose en la fracción de células determinada en (e); (g) determinar el volumen de la muestra que comprende la cantidad seleccionada de células; y (h) administrar el volumen de la muestra determinado en (g) al sujeto.

En algunas realizaciones del método, (a) la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 es un CAR; y (b) la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+, células T CD4+, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células T NK. En algunas realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocromático, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En realizaciones adicionales, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofocianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofocianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRed1, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es una célula T y, en más realizaciones adicionales, la célula T se dispone *in vitro* o la célula T se dispone *in vivo*. En otras realizaciones, la célula T se encuentra en uno de sangre, tejido extraído, tejido cultivado *ex vivo* y medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T autóloga, y en otras realizaciones la célula T es una célula T alogénica. En una realización, la dosis es de  $1,0 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un método para determinar la cantidad de células que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 en una muestra. En una realización, el método comprende (a) proporcionar una muestra que comprende células que se sabe o sospecha que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1; (b) poner en contacto la muestra de (a) con una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, la molécula de unión a antígeno comprendiendo además un marcador detectable, en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión que comprenda una célula presente en la muestra y la molécula de unión a antígeno; y (c) determinar la cantidad de células presentes en un complejo de unión de (b) en la muestra.

En algunas realizaciones del método divulgado, (a) la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es un CAR; y (b) la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+, células T CD4+, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células T NK. En algunas realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GTR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocrómico, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En realizaciones adicionales, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofococianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es una célula T y, en otras realizaciones más, la célula T se dispone *in vitro* o la célula T se dispone *in vivo*. En otras realizaciones, la célula T se encuentra en uno de sangre, tejido extraído, tejido cultivado *ex vivo* y medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T autóloga, y en otras realizaciones la célula T es una célula T alogénica. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un método para determinar una cantidad de células que presentan una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 en una muestra. En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una muestra que comprende células que se sabe o sospecha que presentan una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82; (b) poner en contacto la muestra de (a) con una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82, la molécula de unión a antígeno comprendiendo además un marcador detectable, en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión que comprenda una célula presente en la muestra y la molécula de unión a antígeno; y (c) determinar la cantidad de células presentes en un complejo de unión de (b) en la muestra.

En algunas realizaciones del método divulgado, (a) la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 es un CAR; y (b) la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+, células T CD4+, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células T NK. En algunas realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3),

LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocromático, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En algunas realizaciones, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofococianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es una célula T y, en otras realizaciones más, la célula T se dispone *in vitro* o la célula T se dispone *in vivo*. En otras realizaciones, la célula T se encuentra en uno de sangre, tejido extraído, tejido cultivado *ex vivo* y medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T autóloga, y en otras realizaciones la célula T es una célula T alogénica. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un método para aislar una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1. En una realización, el método comprende (a) proporcionar una muestra que se sabe o se sospecha que comprende una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1; (b) proporcionar una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, que comprende opcionalmente un marcador detectable; (c) poner en contacto la muestra con la molécula de unión a antígeno, en condiciones que permiten la formación de un complejo de unión que comprende la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 y la molécula de unión a antígeno; (d) separar cualquier molécula que no forme parte de un complejo de unión de los complejos de unión formados; y (e) separar un complejo de unión formado en: (a) una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, y (b) una molécula de unión a antígeno.

En realizaciones del método divulgado, la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es un CAR. En realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-Ia/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CD1 Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno se dispone sobre una superficie seleccionada del grupo que consiste en una perla de agarosa, una perla magnética, una placa con pocillos de plástico, una placa con pocillos de vidrio, una placa con pocillos de cerámica y una bolsa de cultivo celular. En algunas realizaciones, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocromático, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En algunas realizaciones, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7,

Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Aloficocianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridinina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un método para aislar una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82. En una realización, el método comprende (a) proporcionar una muestra que se sabe o se sospecha que comprende una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82; (b) proporcionar una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82, que comprende opcionalmente un marcador detectable; (c) poner en contacto la muestra con la molécula de unión a antígeno, en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión que comprenda la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 y la molécula de unión a antígeno; (d) separar cualquier molécula que no forme parte de un complejo de unión de los complejos de unión formados; y (e) separar un complejo de unión formado en: (a) una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82, y (b) una molécula de unión a antígeno.

En algunas realizaciones del método divulgado, la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 es un CAR. En algunas realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-Ia/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Nkp80 (KLRF1), Nkp44, Nkp30, Nkp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGBI, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno se dispone sobre una superficie seleccionada del grupo que consiste en una perla de agarosa, una perla magnética, una placa con pocillos de plástico, una placa con pocillos de vidrio, una placa con pocillos de cerámica y una bolsa de cultivo celular. En algunas realizaciones, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocromico, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En algunas realizaciones, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, aloficocianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Aloficocianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridinina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, un método para determinar la presencia o ausencia de una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 en una muestra. En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una muestra que se sabe o se sospecha que comprende una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1; (b) proporcionar una molécula de unión a antígeno que comprende un marcador detectable que se une específicamente a una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1; (c) poner en contacto la muestra con la molécula de unión a antígeno en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión; (d) separar cualquier molécula que no forme parte de un complejo de unión de los complejos de unión formados; y (e) detectar la presencia o ausencia de un complejo de unión.

En algunas realizaciones, la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es un CAR, y en otras realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CD11a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFTR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, la molécula de unión a antígeno se dispone sobre una superficie seleccionada del grupo que consiste en una perla de agarosa, una perla magnética, una placa con pocillos de plástico, una placa con pocillos de vidrio, una placa con pocillos de cerámica y una bolsa de cultivo celular. En realizaciones adicionales, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocromático, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En más realizaciones adicionales, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxycumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofocianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellow1, naranja Kusabira, mOrange, Alofocianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRed1, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, un método para determinar la presencia o ausencia de una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 en una muestra. En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una muestra que se sabe o se sospecha que comprende una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82; (b) proporcionar una molécula de unión a antígeno que comprende un marcador detectable que se une específicamente a una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82; (c) poner en contacto la muestra con la molécula de unión a antígeno en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión; (d) separar cualquier molécula que no forme parte de un complejo de unión de los complejos de unión formados; y (e) detectar la presencia o ausencia de un complejo de unión.

En algunas realizaciones, la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 es un CAR, y en otras realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CD11a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFTR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, la molécula de unión a antígeno se dispone sobre una superficie seleccionada del grupo que consiste en una perla de agarosa, una perla magnética, una placa con pocillos de plástico, una placa con pocillos de vidrio, una placa con pocillos de cerámica y una bolsa de cultivo celular. En realizaciones adicionales, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocromático, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En más realizaciones adicionales, el

marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofococianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un método para aumentar la concentración de células que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una muestra que comprende una célula que se sabe o se sospecha que presenta una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1; (b) proporcionar una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, que opcionalmente comprende un marcador detectable; (c) poner en contacto la muestra con la molécula de unión a antígeno en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión que comprenda la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 y la molécula de unión a antígeno; (d) eliminar cualquier componente que no forme parte de un complejo de unión; y (e) repetir los pasos (a)-(d) un número deseado de veces.

En una realización, (a) la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es un CAR; y (b) la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+, células T CD4+, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células T NK. En otras realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CD11a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GTR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es una célula T y, en otras realizaciones adicionales, la célula T se dispone *in vitro* o la célula T se dispone *in vivo*. En otras realizaciones, la célula T se encuentra en uno de sangre, tejido extraído, tejido cultivado *ex vivo* y medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T autóloga, y en otras realizaciones la célula T es una célula T alogénica. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma. En realizaciones adicionales, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocrómico, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En realizaciones, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofococianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry.

En otro aspecto más, se proporciona un método para aumentar la concentración de células que presentan una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82. En una realización, el método comprende (a) proporcionar una muestra que comprende una célula que se sabe o sospecha que presenta una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82; (b)



proporcionar una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82, que comprende opcionalmente un marcador detectable; (c) poner en contacto la muestra con la molécula de unión a antígeno en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión que comprenda la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 y la molécula de unión a antígeno; (d) eliminar cualquier componente que no forme parte de un complejo de unión; y (e) repetir los pasos (a)-(d) un número deseado de veces.

En una realización, (a) la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 es un CAR; y (b) la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+, células T CD4+, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células T NK. En otras realizaciones, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CD1 lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es una célula T y, en otras realizaciones más, la célula T se dispone *in vitro* o la célula T se dispone *in vivo*. En otras realizaciones, la célula T se encuentra en uno de sangre, tejido extraído, tejido cultivado *ex vivo* y medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T autóloga, y en otras realizaciones la célula T es una célula T alogénica. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma. En realizaciones adicionales, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocrómico, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno. En realizaciones, el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCherry, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofococianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry.

En otro aspecto, se proporciona un método para agotar una población de células inmunitarias que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una población de células inmunitarias que se van a agotar, en donde se sabe o se sospecha que las células inmunitarias presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1; y (b) poner en contacto las células inmunitarias con una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a (a) la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, y (b) una molécula activadora expresada en la superficie de una célula inmunitaria que no presenta la molécula que comprende la SEQ ID NO:1, en condiciones que permiten la formación de un complejo de unión ternario que comprende la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, la molécula activadora y la molécula de unión a antígeno. En realizaciones adicionales, (a) la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es un CAR; y (b) la célula inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en células T CD8+, células T CD4+, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células T NK. En otras realizaciones más, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1,



ITGAM, CDI1b, ITGAX, CDI1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es una célula T y, en otras realizaciones más, la célula T se dispone *in vitro* o la célula T se dispone *in vivo*. En otras realizaciones, la célula T se encuentra en uno de sangre, tejido extraído, tejido cultivado *ex vivo* y medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T autóloga, y en otras realizaciones la célula T es una célula T alogénica. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un método para agotar una población de células inmunitarias que presentan una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82. En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una población de células inmunitarias que se van a agotar, en donde se sabe o se sospecha que las células inmunitarias presentan una molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82; y (b) poner en contacto las células inmunitarias con una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a (a) la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82, y (b) una molécula activadora expresada en la superficie de una célula inmunitaria que no presenta la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82, en condiciones que permitan la formación de un complejo de unión ternario que comprenda la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82, la molécula activadora y la molécula de unión a antígeno.

En realizaciones adicionales, (a) la molécula que comprende secuencias CDR de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-82 es un CAR; y (b) la célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+, células T CD4+, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células T NK. En otras realizaciones más, el CAR comprende además una molécula, o un fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GTR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es una célula T y, en otras realizaciones más, la célula T se dispone *in vitro* o la célula T se dispone *in vivo*. En otras realizaciones, la célula T se encuentra en uno de sangre, tejido extraído, tejido cultivado *ex vivo* y medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T autóloga, y en otras realizaciones la célula T es una célula T alogénica. Además, en varias realizaciones del método divulgado, la molécula de unión a antígeno comprende una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, y formas humanizadas de la misma.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una serie de gráficos que muestran los resultados de experimentos de citometría de flujo realizados usando células no transducidas (Figura 1A) y células transducidas con un constructo que codifica un CAR que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 (Figura 1B) y luego se pone en contacto con anticuerpos anti-scFv correspondientes a tres clones parentales diferentes (Clon 14, Clon 15 y Clon 17); los gráficos demuestran la unión específica de los anticuerpos al CAR expresado.

La Figura 2 es una serie de gráficos que muestran los resultados de experimentos de citometría de flujo realizados usando células transducidas con un constructo que codifica un CAR que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 y luego se pone en contacto con anticuerpos anti-scFv correspondientes a cinco clones diferentes (Clon 14-1, Clon 14-7, Clon 15, Clon 17-1 y Clon 17-4); los gráficos demuestran la unión específica de los anticuerpos al CAR expresado.

La Figura 3 es una serie de imágenes que representan los resultados de estudios de inmunohistoquímica (IHC) realizados con células que presentan un CAR que comprende el scFv FMC63 anti-CD19; la figura de la izquierda muestra la unión específica del anticuerpo clon 7 al CAR, mientras que la figura de la derecha muestra la unión específica del anticuerpo clon 13 al CAR.

La Figura 4 es una serie de fotografías que representan los resultados de estudios de inmunohistoquímica (IHC) realizados usando células que presentan un CAR que comprende el scFv FMC63 anti-CD19; la Figura 4A demuestra la unión específica de los anticuerpos Clones 7 y 13 al CAR, mientras que la Figura 4B demuestra los

resultados para ambos anticuerpos usando un control de PBMC.

La Figura 5 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VH del clon 7, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa, y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena pesada para este clon.

La Figura 6 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VL del clon 7, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa, y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena ligera para este clon.

La Figura 7 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VH del clon 13, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena pesada para este clon.

La Figura 8 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VL del clon 13, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena ligera para este clon.

La Figura 9 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VH del clon 14-1, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena pesada para este clon.

La Figura 10 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VL del clon 14-1, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena ligera para este clon.

La Figura 11 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VH del clon 14-7, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena pesada para este clon.

La Figura 12 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VL del clon 14-7, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena ligera para este clon.

La Figura 13 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VH del clon 15, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena pesada para este clon.

La Figura 14 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VL del clon 15, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena ligera para este clon.

La Figura 15 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VH del clon 17, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena pesada para este clon.

La Figura 16 es una serie de secuencias que muestran las secuencias codificantes y de aminoácidos para la región VL del clon 17, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR 2 y CDR 3 de la cadena ligera para este clon.

La Figura 17 es una alineación que muestra las secuencias variables de la cadena pesada de los seis anticuerpos distintos identificados (Figura 17A), y un diagrama de clado (Figura 17B) que muestra la relación de las secuencias entre sí.

La Figura 18 es una alineación que muestra las secuencias variables de la cadena ligera de los seis anticuerpos distintos identificados (Figura 18A), y un diagrama de clado (Figura 18B) que muestra la relación de las secuencias entre sí.

La Figura 19 es una tabla que muestra las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras de los seis anticuerpos distintos identificados, asignadas sobre la base del esquema de numeración de Kabat.

La Figura 20 es una tabla que muestra las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras de los seis anticuerpos distintos identificados, asignadas sobre la base del esquema de numeración de Chothia.

La Figura 21 es una tabla que muestra las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras de los seis anticuerpos distintos identificados, asignadas sobre la base del esquema de numeración IMGT.

La Figura 22 muestra los gráficos de citometría de flujo usados para determinar la unión de los clones 14-1, 15 y 17-4 a FMC63 y sus variantes humanizadas (SS, JS, AS, NS).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente enseñanza se refiere a moléculas de unión a antígeno antiidiotípicas, incluyendo anticuerpos, que se unen específicamente a moléculas de unión a antígeno que se unen específicamente a la secuencia de aminoácidos del scFv FMC63 anti-CD19 (véase, *Nicholson et al.*, (1997) *Mol Immunol* 34(16-17):1157-65).

El scFv FMC63 anti-CD19 tiene la secuencia de aminoácidos:

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT  
 VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF  
 5 CQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ  
 ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL  
 10 GVIWGSETTYYNLSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA  
 IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

También se proporcionan formas humanizadas de las moléculas de unión a antígeno, moléculas que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19 y células que presentan una molécula que comprende el scFv FMC63 anti-CD19. Además, también se divulgan polinucleótidos que codifican las moléculas de unión a antígeno, así como vectores que comprenden los polinucleótidos, y células *in vitro* que comprenden los polinucleótidos y vectores.

Se proporcionan métodos de uso de las moléculas de unión a antígeno divulgadas. Las moléculas de unión a antígeno, los polinucleótidos, los vectores, las células *in vitro* y los métodos descritos en la presente pueden usarse en una serie de aplicaciones, por ejemplo como reactivos para detectar la presencia de fracciones que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas, cuantificar la cantidad de una fracción que comprende el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas, cribar fracciones que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas, purificar fracciones comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas, y estudios de biomarcadores centrados en fracciones que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas. También se proporcionan usos terapéuticos, por ejemplo aplicaciones en las que se modula (mejora o reprime) la actividad biológica de una fracción que comprende el scFv FMC63 anti-CD19, así como células que presentan dichas moléculas, así como estudios de intervalo de dosis relacionados con agentes terapéuticos que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas, y células que presentan dichas moléculas.

Las moléculas de unión a antígeno (anticuerpos) divulgadas en la presente se generaron a partir de hibridomas generados usando células B de origen conejo, pero pueden humanizarse fácilmente usando métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica, así como los descritos en la presente. Las formas humanizadas representativas de las moléculas de unión a antígeno divulgadas pueden generarse como se describe en la presente.

## 1. Definiciones

Para que la presente divulgación pueda entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Como se usan en la presente solicitud, salvo que se indique expresamente lo contrario, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado que se expone a continuación. A lo largo de la solicitud se incluyen definiciones adicionales. Los encabezamientos que figuran en la presente no son limitaciones de los varios aspectos de la divulgación, que deben entenderse por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto.

Se entiende que, siempre que en la presente se describan aspectos con la expresión "que comprende", también se proporcionan otros aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

Las unidades, prefijos y símbolos usados en la presente se proporcionan usando su forma aceptada por el *Système International de Unites* (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica con la que se relaciona esta divulgación. Por ejemplo, Juo, *The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, 2ª ed., (2001), CRC Press; *The Dictionary of Cell & Molecular Biology*, 5ª ed., (2013), Academic Press; y *The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology*, Cammack et al. eds., 2ª ed., (2006), Oxford University Press, proporcionan a los expertos en la técnica un diccionario general para muchos de los términos usados en esta divulgación.

Como se usan en la presente, los veinte aminoácidos convencionales (por ejemplo, de origen natural) y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase, por ejemplo, *Immunology - A Synthesis* (2ª Edición), Golub y Green, eds., Sinauer Assoc., Sunderland, Mass. (1991). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales como aminoácidos alfa-, alfa-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los

polipéptidos de la presente enseñanza. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, e-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, sigma-N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en la presente, la dirección izquierda es la dirección terminal amino y la dirección derecha es la dirección terminal carboxi, en de acuerdo con el uso y la convención estándar.

Como se usan en la presente, los términos "un" y "uno" se usan según la convención estándar y significan uno o más, a menos que el contexto indique lo contrario.

Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a un valor o composición que se encuentra dentro de un margen de error aceptable para el valor o composición en particular, según lo determinado por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor o composición, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" puede significar dentro de una o más de una desviación estándar según la práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" o "compuesto esencialmente de" puede significar un intervalo de hasta el 10% (es decir,  $\pm 10\%$ ). Por ejemplo, aproximadamente 5 mg puede incluir cualquier número entre 4,5 mg y 5,5 mg. Además, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces de un valor. Cuando en la presente divulgación se proporcionan valores o composiciones particulares, a menos que se indique lo contrario, debe asumirse que el significado de "aproximadamente" o "compuesto esencialmente de" está dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor o composición particular.

Como se describe en la presente, debe entenderse que cualquier intervalo de concentraciones, intervalo de porcentajes, intervalo de proporciones o intervalo de números enteros incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo mencionado y, cuando proceda, fracciones de los mismos (como la décima parte y la centésima parte de un número entero), a menos que se indique lo contrario.

Como se usa en la presente, el término "y/o" debe entenderse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Así, se pretende que el término "y/o", como se usa en una frase como "A y/o B" en la presente, incluya "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). De igual manera, se pretende que el término "y/o", como se usa en una frase como "A, B, y/o C" abarque cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Como se usa en la presente, el término el uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse en el sentido de uno, ambos, o cualquier combinación de los mismos de las alternativas.

Como se usa en la presente, el término "alogénico" se refiere a cualquier material derivado de un individuo que luego se introduce en otro individuo de la misma especie, por ejemplo, el trasplante alogénico de células T.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" (Ab) incluye, sin limitación, una inmunoglobulina glucoproteica que se une específicamente a un antígeno. En general, un anticuerpo puede comprender por lo menos dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) interconectadas por enlaces disulfuro, o una molécula de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena HC comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena LC comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio constante, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo terminal amino a extremo terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los Abs pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente del sistema clásico del complemento (C1q). El término "anticuerpo" también abarca una inmunoglobulina intacta o una porción de unión a antígeno de la misma que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique lo contrario. Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno incluyen, entre otras, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticuerpos de dominio (dAbs), fragmentos que incluyen regiones determinantes de la complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y polipéptidos que contienen por lo menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión específica a antígeno al polipéptido.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos tanto de origen natural como de origen no natural (producidos recombinantemente), anticuerpos humanos y no humanos, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), inmunoglobulinas, anticuerpos sintéticos, anticuerpos tetraméricos que

comprenden dos moléculas de cadena pesada y dos de cadena ligera, un monómero de cadena ligera de anticuerpo, un monómero de cadena pesada de anticuerpo, un dímero de cadena ligera de anticuerpo, un dímero de cadena pesada de anticuerpo, un par de cadena ligera de anticuerpo-cadena pesada de anticuerpo, intracuerpos (véase, por ejemplo, Stocks, (2004) Drug Discovery Today 9(22):960-66), fusiones de anticuerpos (término que engloba los conjugados anticuerpo-fármaco) y que a veces se denominan en la presente "conjugados de anticuerpos"), anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos de dominio único, anticuerpos monovalentes, anticuerpos de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos camelizados, aficuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, Fv enlazados a disulfuro (sdFv), anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-anti-Id), minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en la presente "miméticos de anticuerpos") y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente se refieren a poblaciones de anticuerpos policlonales.

Un anticuerpo no humano puede humanizarse usando métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en humanos, como se divulga en la presente, con respecto a anticuerpos que se unen específicamente al scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas. Donde no se indique expresamente, y a menos que el contexto indique lo contrario, el término "anticuerpo" también incluye un fragmento de unión a antígeno de una molécula de unión a antígeno de cualquiera de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, e incluye un fragmento o porción monovalente y divalente, y un anticuerpo de cadena sencilla (es decir, un scFv).

En varias realizaciones, un anticuerpo se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un CAR (o componente del mismo) que comprende la SEQ ID NO: 1, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas; las células que presentan SEQ ID NO:1 pueden ser, pero no necesariamente, una célula inmunitaria, como una célula T.

Como se usa en la presente, el término "antígeno" se refiere a cualquier molécula que provoque una respuesta inmunitaria o que sea capaz de ser unida por un anticuerpo u otra molécula de unión a antígeno. La respuesta inmunitaria puede implicar o la producción de anticuerpos, o la activación de células específicas inmunológicamente competentes, o ambas. Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos (incluido el scFv FMC63 anti-CD19; SEQ ID NO: 1), así como las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan dichas moléculas), puede servir como antígeno. Generalmente, un antígeno puede expresarse endógenamente, es decir, ser expresado por ADN genómico, o puede expresarse recombinantemente, o puede sintetizarse químicamente. En una realización particular, un antígeno comprende la totalidad o una parte del scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia, que opcionalmente se conjugan con un adyuvante como la hemocianina de lapa californiana (KLH), o con un Fc para facilitar el cribado.

Como se usa en la presente, el término "molécula de unión a antígeno" se refiere a una proteína que comprende una porción que se une a un antígeno o proteína diana y, opcionalmente, una porción de andamiaje o estructura que permite que la porción de unión a antígeno adopte una conformación que promueve la unión de la molécula de unión a antígeno al antígeno. Los ejemplos de tipos representativos de moléculas de unión a antígeno incluyen un scFv, un anticuerpo humano, de ratón o de conejo; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo recombinante; un anticuerpo de cadena sencilla; un diabucuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; un fragmento Fab; un fragmento F(ab')<sub>2</sub>; un anticuerpo de IgD; un anticuerpo de IgE; un anticuerpo de IgM; un anticuerpo de IgG1; un anticuerpo de IgG2; un anticuerpo de IgG3; o un anticuerpo de IgG4, y fragmentos de los mismos.

Una molécula de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo, un andamiaje proteico alternativo o un andamiaje artificial con regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas o derivados de CDR. Tales andamiajes incluyen, pero no se limitan a, andamiajes derivados de anticuerpos que comprenden mutaciones introducidas para, por ejemplo, estabilizar la estructura tridimensional de la molécula de unión a antígeno, así como andamiajes totalmente sintéticos que comprenden, por ejemplo, un polímero biocompatible. Véase, por ejemplo, Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 53(1):121-129 (2003); Roque et al., Biotechnol. Prog. 20:639-654 (2004). Además, como andamiaje pueden usarse miméticos de anticuerpos peptídicos ("PAM"), así como andamiajes basados en miméticos de anticuerpos que utilizan diversos componentes (por ejemplo, fibronectina). Una molécula de unión a antígeno puede tener, por ejemplo, la estructura de una inmunoglobulina de origen natural.

Una molécula de unión a antígeno puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina humana natural tiene típicamente dos sitios de unión idénticos, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes, y es capaz de unirse específicamente a dos antígenos diferentes (por ejemplo, el scFv FMC63 anti-CD19 y una molécula activadora de la superficie celular).

En varias realizaciones, una molécula de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento del mismo, que

incluye una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) divulgadas en la presente y mostradas en las FIGURAS 5-21, que se unen específicamente al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, y a células que presentan tales moléculas. En otras realizaciones, la molécula de unión a antígeno se une a un CAR que comprende el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, y puede expresarse en una célula inmunitaria, como una célula T.

El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que se va a reintroducir posteriormente. Por ejemplo, los métodos de terapia celular autóloga manipulada (eACT™) descritos en la presente implican la recogida de linfocitos de un paciente, que luego se manipulan para que expresen un constructo, por ejemplo, un constructo CAR, y luego se administran de nuevo al mismo paciente.

Como se usa en la presente, el término "afinidad de unión" significa la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno como un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación ( $K_D$ ). La afinidad puede medirse y/o expresarse de varias maneras conocidas en la técnica que incluyen, entre otras, la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) y la constante de asociación de equilibrio ( $K_A$ ). La  $K_D$  se calcula a partir del cociente de  $k_{off}/k_{on}$ , mientras que la  $K_A$  se calcula a partir del cociente de  $k_{on}/k_{off}$ .  $k_{on}$  se refiere a la constante de tasa de asociación de, por ejemplo, un anticuerpo a un antígeno, y  $k_{off}$  se refiere a la disociación de, por ejemplo, un anticuerpo a un antígeno. La  $k_{on}$  y la  $k_{off}$  pueden determinarse mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica, como BIAcore® o KinExA o resonancia de plasmón de superficie.

Como se usa en la presente, el término "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a una secuencia de aminoácidos que contribuye a la especificidad y afinidad de unión del antígeno. Las regiones marco pueden ayudar a mantener la confirmación adecuada de las CDR para promover la unión entre la molécula de unión a antígeno y un antígeno. Comúnmente se usan una serie de definiciones de las CDR: numeración de Kabat, numeración de Chothia, numeración AbM o numeración de contacto. La definición AbM es un compromiso entre los sistemas de Kabat y Chothia, y es usada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. La Tabla A define las CDR usando cada sistema de numeración. La definición de contacto se basa en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles.

**Tabla A**

Lazo	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
H1	H31--H35	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

El término "numeración de Kabat" y términos similares son reconocidos en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una molécula de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (véase, por ejemplo, Kabat et al. en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., NIH Publication 91-3242, Bethesda MD 1991). Usando el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena pesada de anticuerpo están típicamente presentes en las posiciones de aminoácidos 31 a 35, que opcionalmente pueden incluir uno o dos aminoácidos adicionales, a continuación de la 35 (denominados en el esquema de numeración de Kabat 35A y 35B) (CDR1), posiciones de aminoácidos 50 a 65 (CDR2), y posiciones de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Usando el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena ligera de anticuerpo están típicamente presentes en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), las posiciones de aminoácidos 50 a 56 (CDR2), y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). En algunas realizaciones, las CDR de los anticuerpos descritos en la presente pueden describirse de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat, como se muestra en la Figura 6 (aunque pueden interpretarse fácilmente en otros sistemas de numeración usando la Tabla A anterior).

En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que se refiere a la ubicación de los lazos estructurales de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et al., (1997) J Mol Biol 273: 927-948;

Chothia C et al., (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A et al., (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; y la Patente de Estados Unidos N° 7,709,226). Típicamente, cuando se usa la convención de numeración de Kabat, el lazo CDR-H1 de Chothia se encuentra en los aminoácidos de cadena pesada 26 a 32, 33 o 34, el lazo CDR-H2 de Chothia se encuentra en los aminoácidos de cadena pesada 52 a 56, y el lazo CDR-H3 de Chothia se encuentra en los aminoácidos de cadena pesada 95 a 102, mientras que el lazo CDR-L1 de Chothia se encuentra en los aminoácidos 24 a 34 de la cadena ligera, el lazo CDR-L2 de Chothia se encuentra en los aminoácidos 50 a 56 de la cadena ligera y el lazo CDR-L3 de Chothia se encuentra en los aminoácidos 89 a 97 de la cadena ligera. El final del lazo CDR-HI de Chothia cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del lazo (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat sitúa las inserciones en H35A y H35B; si no están presentes ni 35A ni 35B, el lazo termina en 32; si sólo está presente 35A, el lazo termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el lazo termina en 34). Véase la Tabla A. En algunas realizaciones, las CDR de los anticuerpos descritos en la presente se han determinado de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, como se muestra en la FIGURA 20.

Como se usa en la presente, una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). En ciertas realizaciones, uno o más residuos de aminoácidos dentro de una o varias CDR o dentro de una o varias regiones marco de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno proporcionados en la presente (o fragmento del mismo) pueden sustituirse por un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos, que se incluyen en la presente divulgación, pueden abarcar residuos de aminoácidos de origen no natural, que se incorporan típicamente por síntesis química de péptidos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen los peptidomiméticos y otras formas invertidas de fracciones de aminoácidos. Los residuos de origen natural pueden dividirse en clases basadas en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;  
 hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;  
 ácidos: Asp, Glu;  
 básicos: His, Lys, Arg;  
 residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y  
 aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse, por ejemplo, en regiones de un anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula. En la Tabla B se exponen sustituciones de aminoácidos conservadoras ejemplares.

**Tabla B**

<b>Residuos originales</b>	<b>Sustituciones ejemplares</b>	<b>Sustituciones preferidas</b>
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile

(continuación)

<b>Residuos originales</b>	<b>Sustituciones ejemplares</b>	<b>Sustituciones preferidas</b>
Lys	Arg, ácido 1,4 diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Como se usan en la presente, los términos "región constante" y "dominio constante" son intercambiables y tienen un significado común en la técnica. La región constante es una porción de anticuerpo, por ejemplo, una porción terminal carboxilo de una cadena ligera y/o pesada que no está directamente implicada en la unión de un anticuerpo al antígeno pero que puede presentar varias funciones efectoras, como la interacción con el receptor Fc. La región constante de una molécula de inmunoglobulina generalmente tiene una secuencia de aminoácidos más conservada que el dominio variable de una inmunoglobulina.

Como se usa en la presente, el término "compite de manera cruzada" se refiere a la situación en la que la interacción entre un antígeno y una primera molécula de unión a antígeno o fragmento de unión de la misma bloquea, limita, inhibe o reduce de otro modo la capacidad de una molécula de unión a antígeno de referencia o fragmento de unión de la misma de interactuar con el antígeno. La competencia cruzada puede ser completa, por ejemplo, la unión de la molécula de unión al antígeno bloquea completamente la capacidad de la molécula de unión de referencia para unirse al antígeno, o puede ser parcial, por ejemplo, la unión de la molécula de unión al antígeno reduce la capacidad de la molécula de unión de referencia para unirse al antígeno. En ciertas realizaciones, una molécula de unión a antígeno que compite de manera cruzada con una molécula de unión a antígeno de referencia se une al mismo epítipo o a un epítipo solapado que la molécula de unión a antígeno de referencia. En otras realizaciones, la molécula de unión a antígeno que compite de manera cruzada con una molécula de unión a antígeno de referencia se une a un epítipo diferente al de la molécula de unión a antígeno de referencia. Para determinar si una molécula de unión a antígeno compite con otra pueden usarse numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida; inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida; ensayo de competencia en sándwich (Stahli et al., (1983) Method Enzymol 9:242-53); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (Kirkland et al., (1986) J Immunol 137:3614-19); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo sándwich marcado directo en fase sólida (Harlow y Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA marcado directo en fase sólida usando el marcador <sup>125</sup>I (Morel et al., (1988) Molec Immunol 25:7-15); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (Cheung et al., (1990) Virology 176:546-52); y RIA marcado directo (Moldenhauer et al., (1990) Scand J Immunol 32:77-82).

El término "derivado" se refiere a una molécula que incluye una modificación química distinta de una inserción, delección o sustitución de aminoácidos (o ácidos nucleicos). En ciertas realizaciones, los derivados comprenden modificaciones covalentes incluyendo, pero no limitadas a, la unión química con polímeros, lípidos u otras fracciones orgánicas o inorgánicas. En ciertas realizaciones, una molécula de unión a antígeno modificada químicamente (un derivado) puede tener una semivida circulante mayor que una molécula de unión a antígeno que no esté modificada químicamente. En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno derivada se modifica covalentemente para que incluya uno o más enlaces poliméricos solubles en agua, incluyendo, pero no limitados a, polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol.

Como se usa en la presente, el término "diacuerpo" o dAB se refiere a anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas polipeptídicas, en donde cada cadena polipeptídica comprende dominios VH y VL unidos por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios de la misma cadena, permitiendo por tanto que cada dominio se empareje con un dominio complementario de otra cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, Holliger et al., (1993) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90:6444-48, Poljak et al., (1994) Structure 2: 1121-23, y Perisic et al., (1994) Structure 2(12): 1217-26). Si las dos cadenas polipeptídicas de un diacuerpo son idénticas, el diacuerpo resultante de su emparejamiento tendrá dos sitios de unión a antígeno idénticos. Pueden usarse cadenas polipeptídicas que tengan secuencias diferentes para crear un diacuerpo con dos sitios de unión a antígenos diferentes. De manera similar, los tricuerpos y los tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas polipeptídicas, respectivamente, y que forman tres y cuatro sitios de unión a antígenos, respectivamente, que pueden



ser iguales o diferentes.

Como se usa en la presente, un "epítipo" es un término de la técnica y se refiere a una región localizada de un antígeno a la que puede unirse específicamente un anticuerpo. Un epítipo puede ser, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (epítipo lineal o contiguo) o un epítipo puede, por ejemplo, unirse a partir de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o polipéptidos (epítipo conformacional, no lineal, discontinuo o no contiguo). En ciertas realizaciones, el epítipo al que se une un anticuerpo puede determinarse mediante, por ejemplo, espectroscopia de NMR, estudios de cristalografía por difracción de rayos X, ensayos ELISA, intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado con espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas por electro pulverización de cromatografía líquida), ensayos de barrido de oligopéptidos basados en matrices, y/o mapeo de mutagénesis (por ejemplo, mapeo de mutagénesis dirigida al sitio). Para la cristalografía de rayos X, la cristalización puede realizarse usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Giege et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson, (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen, (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson, (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Los cristales de anticuerpo:antígeno pueden estudiarse usando técnicas de difracción de rayos X bien conocidas y pueden refinarse usando programas informáticos como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo, *Meth Enzymol* (1985) Vols 114 & 115, eds Wyckoff et al.), y BUSTER (Bricogne, (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne, (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed. Carter. Carter; Roversi et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Los estudios de mapeo de mutagénesis pueden realizarse usando cualquier método conocido por un experto en la técnica. Para una descripción de técnicas de mutagénesis, incluyendo técnicas de mutagénesis de barrido de alanina y arginina véase, por ejemplo, Champe et al., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-94 y Cunningham & Wells, (1989) *Science* 244: 1081-85.

Como se usa en la presente, el término "fragmento Fab" significa que es un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y CH; un "fragmento F(ab')<sub>2</sub>" es un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; un "fragmento Fv" tiene los dominios VH y VL de un solo brazo de un anticuerpo; y un "fragmento dAb" tiene un dominio VH, un dominio VL o un fragmento de unión a antígeno de un dominio VH o VL.

Como se usan en la presente, los términos "se une inmuno-específicamente", "reconoce inmuno-específicamente", "se une específicamente" y "reconoce específicamente" son términos análogos y se usan indistintamente en el contexto de las moléculas de unión a antígeno, y significan que una molécula dada se une preferentemente a un antígeno (por ejemplo, epítipo o complejo inmunitario) como es entendida la unión por un experto en la técnica. Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos, pero con una afinidad comparativamente menor según se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore®, instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), u otros ensayos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno se unen al antígeno con una K<sub>A</sub> que es por lo menos 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 4 logs o mayor que la K<sub>A</sub> cuando las moléculas se unen a otro antígeno.

En otra realización, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, el scFv FMC63 anti-CD19; SEQ ID NO: 1), así como las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan tales moléculas se unen con una constante de disociación (K<sub>d</sub>) de aproximadamente 1 x 10<sup>-7</sup> M. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno (por ejemplo, el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas) con "alta afinidad" cuando la K<sub>d</sub> es de aproximadamente 1 x 10<sup>-9</sup> M a aproximadamente 5 x 10<sup>-9</sup> M. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno (por ejemplo, el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas) con "afinidad muy alta" cuando la K<sub>d</sub> es de 1 x 10<sup>-10</sup> M a aproximadamente 5 x 10<sup>-10</sup> M.

En otra realización más, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, el scFv FMC63 anti-CD19, así como las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan tales moléculas) no reaccionan de manera cruzada con otras proteínas en condiciones de unión similares. En algunas realizaciones, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, el scFv FMC63 anti-CD19, así como las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan tales moléculas) no presentan reacción cruzada con otras proteínas que no comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan tales moléculas. En algunas realizaciones, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas, con mayor afinidad que a otro antígeno no relacionado. En ciertas realizaciones, en la presente se proporciona una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo) o fragmento del mismo que se une al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas, con una afinidad del 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o mayor que a otro antígeno no relacionado, medida mediante, por ejemplo, un radioinmunoensayo, resonancia de plasmón de superficie o ensayo de exclusión cinética. En algunas realizaciones, el grado de unión de una molécula de unión a antígeno, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que

se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas, descritas en la presente en comparación con una proteína no relacionada que no comprende el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas, es menor del 10%, 15% o 20% de la unión del anticuerpo a la proteína de fragmento conector según se mide mediante, por ejemplo, un radioinmunoensayo.

Como se usa en la presente, el término "cadena pesada" cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), gamma ( $\gamma$ ) y mu ( $\mu$ ), sobre la base de la secuencia de aminoácidos del dominio constante, que dan lugar a las clases de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo las subclases de IgG, por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>.

Como se usa en la presente, el término "inmunoglobulina" se refiere a una molécula inmunitaria de cualquiera de los isotipos comúnmente conocidos, que incluyen pero no se limitan a IgA, IgA secretora, IgG e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, entre otras, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> humanas. Muchas de las moléculas descritas en la presente son inmunoglobulinas. Como se usa en la presente, "isotipo" significa la clase o subclase de anticuerpos (por ejemplo, IgM o IgG<sub>1</sub>) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Una inmunoglobulina es una molécula tetramérica, compuesta normalmente por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par teniendo una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción terminal amino de cada cadena incluye una región variable de entre 100 y 130 aminoácidos o más, responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción terminal carboxi de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican en cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA o IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos o más. Véase, en general, Berzofsky & Berkower, Capítulo 7 en Fundamental Immunology (Paul, W., ed., Lippincott Williams & Wilkins (2012)). Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo, de tal manera que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de unión primarios.

Las cadenas de inmunoglobulina de origen natural presentan la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o "CDR". De extremo N-terminal a extremo C-terminal, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio puede hacerse de acuerdo con las definiciones de Kabat (véase, por ejemplo, Kabat et al. en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)) o Chothia (Chothia, usado en la presente, (véase, por ejemplo, Chothia & Lesk (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883 o Honegger & Pluckthun (2001), J Mol Biol 309:657-670). Los sistemas de numeración de Kabat, Chothia, IGMT y Abm (Oxford Molecular) se describen con más detalle en la presente.

Como se usa en la presente, el término "célula *in vitro*" se refiere a cualquier célula que se cultive *ex vivo*. Una célula *in vitro* puede incluir una célula humana, como una célula T o una célula dendrítica, o puede incluir células CHO, SP2/0, de conejo y otras células no humanas.

Como se usa en la presente, el término "cadena ligera" cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, kappa ( $\kappa$ ) o lambda ( $\lambda$ ) sobre la base de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. En la técnica se conocen las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera. En realizaciones específicas, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

El término "neutralizante" se refiere a una molécula de unión a antígeno, scFv, anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une a un ligando (por ejemplo, una fracción que comprende el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas) e impide o reduce el efecto biológico de ese ligando. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno, scFv, anticuerpo, o un fragmento del mismo, bloquea directamente un sitio de unión en el ligando o altera de otro modo la capacidad de unión del ligando a través de medios indirectos (como alteraciones estructurales o energéticas en el ligando). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno, el scFv, el anticuerpo o un fragmento del mismo impide que la proteína a la que está unida realice una función biológica.

Como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a cualquier ser humano que esté siendo tratado por una condición fisiológica anormal, como el cáncer, o al que se le haya diagnosticado formalmente un trastorno, aquellos sin trastornos formalmente reconocidos, aquellos que reciben atención médica, aquellos con riesgo de desarrollar los trastornos, etc. En la presente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente e incluyen tanto a sujetos humanos como a sujetos animales no humanos.

Como se usan en la presente, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente, y significan un compuesto que comprende residuos de aminoácidos enlazados covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener por lo menos dos aminoácidos, pero no se impone ninguna limitación sobre el número máximo de aminoácidos que pueden componer la secuencia de una proteína o péptido. El término polipéptido abarca cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Como se usa en la presente, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente péptidos, oligopéptidos y oligómeros, como a cadenas más largas, que generalmente se denominan proteínas. "Polipéptidos" incluye, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. El término "polipéptido" incluye péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

En algunos aspectos, los polipéptidos y/o proteínas tienen delecciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la molécula de unión a antígeno. Los fragmentos polipeptídicos útiles pueden incluir fragmentos inmunológicamente funcionales de moléculas de unión a antígeno, incluyendo, entre otras, una o más regiones CDR, dominios variables de una cadena pesada y/o ligera, una porción de otras porciones de una cadena de anticuerpo, y similares. Las fracciones que pueden sustituirse por uno o más aminoácidos de una molécula de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, formas D o L de aminoácidos, un aminoácido diferente del aminoácido que se encuentra normalmente en la misma posición de una molécula de unión a antígeno (con respecto a las SEQ ID NO: 2-73), delecciones, aminoácidos de origen no natural y análogos químicos de aminoácidos.

Los análogos peptídicos se usan habitualmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido plantilla y constituyen un aspecto de la presente divulgación. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Véase, por ejemplo, Fauchere, (1986) Adv. Drug Res. (Testa, ed.) 15:29-69; Veber & Freidinger, (1985) TINS, p.392; y Evans et al., (1987) J. Med. Chem, 30:1229-39.

Están específicamente comprendidas en los términos los polipéptidos, péptidos, proteínas y moléculas análogas que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19, así como las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan dichas moléculas.

Como se usa en la presente, el término "porcentaje de identidad" significa el porcentaje de residuos idénticos entre los aminoácidos o nucleótidos en las moléculas comparadas. Para estos cálculos, los huecos en los alineamientos (si los hay) deben abordarse mediante un modelo matemático o programa informático particular (es decir, un "algoritmo"). Los métodos que pueden usarse para calcular la identidad de los ácidos nucleicos o polipéptidos alineados incluyen los descritos en Computational Molecular Biology, (Lesk, ed.), (1988) Nueva York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, ed.), 1993, Nueva York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin y Griffin, eds.), 1994, Nueva Jersey: Humana Press; von Heinje, (1987) Sequence Analysis in Molecular Biology, Nueva York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov y Devereux, eds.), 1991, Nueva York: M. Stockton Press; y Carillo et al., (1988) J. Applied Math. 48:1073.

Para calcular el porcentaje de identidad, las secuencias comparadas se alinean de manera que se obtenga la mayor coincidencia entre las secuencias. El programa informático usado para determinar el porcentaje de identidad puede ser, por ejemplo, MOE (Chemical Computing Group) o DNASTAR (University of Wisconsin, Madison, WI). Puede usarse el algoritmo informático GAP para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los que se desea determinar el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias se alinean para obtener una coincidencia óptima de sus aminoácidos o nucleótidos respectivos (el "intervalo coincidente", determinado por el algoritmo). Junto con el algoritmo se usan una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal media, en donde la "diagonal media" es la media de la diagonal de la matriz de comparación que se está usando; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácidos por la matriz de comparación concreta) y una penalización por extensión de hueco (que habitualmente es de 1/10 veces la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación como PAM 250 o BLOSUM 62. En ciertas realizaciones, se usa una matriz de comparación estándar (véase, por ejemplo, Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62).

Ciertos esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado la coincidencia de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta aunque no haya una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, puede ajustarse el método de alineación seleccionado (por ejemplo, el programa GAP) si se desea para dar como resultado una alineación que abarque por lo menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Como se usan en la presente, los términos "anticuerpo de cadena sencilla" y "fragmento variable de cadena sencilla (scFv)" se usan indistintamente y significan una molécula de unión a antígeno en la que una región VL y una región VH se unen mediante un conector para formar una cadena proteica continua en donde el conector es lo

suficientemente largo como para permitir que la cadena proteica se pliegue sobre sí misma y forme un sitio de unión a antígeno monovalente (véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-26 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-83 (1988). FMC63 es un ejemplo específico de un scFv.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis eficaz", "cantidad eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico, (por ejemplo, una fracción que comprende el scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas), es cualquier cantidad que, cuando se usa sola o en combinación con otro agente terapéutico, protege a un sujeto contra la aparición de una enfermedad o promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los periodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debidos a la afección de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad puede evaluarse mediante varios métodos conocidos por los profesionales cualificados, como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales que predicen la eficacia en seres humanos, o evaluando la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

Los términos "transducción" y "transducido" se refieren al proceso mediante el cual se introduce ADN extraño en una célula a través de un vector viral (véase Hartl y Jones (1997) "Genetics: Principles and Analysis", 4ª ed., Jones & Bartlett). En algunas realizaciones, el vector es un vector retroviral, un vector de ADN, un vector de ARN, un vector adenoviral, un vector baculoviral, un vector viral de Epstein Barr, un vector papoviral, un vector viral de vaccinia, un vector viral de herpes simplex, un vector asociado a adenovirus, un vector lentiviral o cualquier combinación de los mismos.

Como se usan en la presente, los términos "región variable" o "dominio variable" se usan indistintamente y significan una porción de un anticuerpo, generalmente, una porción de una cadena ligera o pesada, típicamente sobre el extremo terminal amino del anticuerpo y que comprende aproximadamente 100-130 aminoácidos en la cadena pesada y aproximadamente de 90 a 115 aminoácidos en la cadena ligera, que difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en las regiones denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), mientras que las regiones más conservadas del dominio variable se denominan regiones marco (FR). Las CDR de las cadenas ligera y pesada son las principales responsables de la interacción y especificidad del anticuerpo con el antígeno.

En ciertas realizaciones, la región variable de una molécula de unión a antígeno es una región variable humana. En realizaciones adicionales, la región variable comprende CDR de roedor, humanas o murinas y regiones marco (FR) humanas. En realizaciones adicionales, la región variable es una región variable de primate (por ejemplo, un primate no humano). En otras realizaciones adicionales, la región variable es una región variable de conejo. En otras realizaciones, la región variable comprende CDR humanas y regiones marco (FR) no humanas (por ejemplo, de conejo, murino, rata o primate no humano). En otras realizaciones, la región variable comprende CDR no humanas (por ejemplo, de conejo, murino, rata o primate no humano) y regiones marco (FR) humanas.

Los términos "VH", "dominio VH" y "cadena VH" se usan indistintamente y significan la región variable de cadena pesada de una molécula de unión a antígeno, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los términos "VL", "dominio VL" y "cadena VL" se usan indistintamente y significan la región variable de cadena ligera de una molécula de unión a antígeno, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En las siguientes subsecciones se describen con más detalle varios aspectos de la enseñanza.

## **II. Moléculas de unión a antígeno y polinucleótidos que las codifican**

La presente divulgación está dirigida a moléculas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos, que se unen específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas, y/o aquellas que compiten de manera cruzada con una o más moléculas de unión a antígeno descritas en la presente (es decir, una o más de las descritas en las FIGURAS 5-21 y/o divulgadas en el Listado de Secuencias adjunto). También se proporcionan polinucleótidos que codifican las moléculas de unión a antígeno, y constituyen un aspecto de la presente divulgación.

Un anticuerpo o molécula de unión a antígeno codificado de la presente enseñanza puede ser de cadena sencilla o de cadena doble. En algunas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno es de cadena sencilla. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un scFv, un Fab, un Fab', un Fv, un F(ab')<sub>2</sub>, un dAb, y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende un scFv.

En ciertas realizaciones, una molécula de unión a antígeno como un anticuerpo comprende una cadena sencilla, en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están conectadas

mediante un conector (por ejemplo, un scFv). En algunas realizaciones, la VH está situada en el extremo N terminal del conector y la VL está situada en el extremo C terminal del conector. En otras realizaciones, la VL está situada en el extremo N terminal del conector y la VH está situada en el extremo C terminal del conector. En algunas realizaciones, el conector comprende por lo menos aproximadamente 5, por lo menos aproximadamente 8, por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 13, por lo menos aproximadamente 15, por lo menos aproximadamente 18, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 25, por lo menos aproximadamente 30, por lo menos aproximadamente 35, por lo menos aproximadamente 40, por lo menos aproximadamente 45, por lo menos aproximadamente 50, por lo menos aproximadamente 60, por lo menos aproximadamente 70, por lo menos aproximadamente 80, por lo menos aproximadamente 90, o por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos. En algunas realizaciones, el conector comprende entre aproximadamente 8 aminoácidos y aproximadamente 18 aminoácidos (por ejemplo, 10 aminoácidos).

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen específicamente al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas. En ciertas realizaciones, una molécula de unión a antígeno de la presente divulgación se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas con una  $K_D$  de menos de  $1 \times 10^{-6}$  M, menos de  $1 \times 10^{-7}$  M, menos de  $1 \times 10^{-8}$  M, o menos de  $1 \times 10^{-9}$  M. En una realización particular, una molécula de unión a antígeno se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas, con una  $K_D$  de menos de  $1 \times 10^{-7}$  M. En otra realización, una molécula de unión a antígeno se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas, con una  $K_D$  de menos de  $1 \times 10^{-8}$  M. En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno se une al scFv FMC63 anti-CD19, así como a moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas, con una  $K_D$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $2 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $3 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $4 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $6 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $7 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $8 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $9 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $2 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $3 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $4 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $6 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $7 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $8 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $9 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $2 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $3 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $4 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $6 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $7 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $8 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $9 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M, o aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  M. La  $K_D$  puede calcularse usando metodologías estándar, como se describe en la presente.

En realizaciones específicas, una molécula de unión a antígeno de la presente divulgación es un anticuerpo identificado en la presente como Clon 7, Clon 13, Clon 14-1, Clon 14-7, Clon 15 o Clon 17, y cada uno comprende las siguientes secuencias de aminoácidos, codificantes, variables y CDR de cadena pesada y ligera, como se proporcionan y etiquetan:

#### Clon 7 VH ADN

```

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTTCGCTGTGCTCAAAGGTGT
CCAGTGTCAGGAGCAGCTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCT
GGAGGAACCCTGACAGTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTA
ACAATGGAATTTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG
GATCGGATGTCTTTATGTTGGTAGTAGTGATACCACTTACTACGCGAGCT
GGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAAGCTCGTTCGACCACGGTGAC
TCTACAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTA
CGATAAATCTCGGCTTGTGGGGCCCCGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 2)

```

#### Clon 7 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLLEESGGDLVKPGGTLTVTCKASGFSFSN  
NGICWVRQAPGKGLEWIGCLYVGSSDTTYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQ  
 MSLTVADTATYFCTINLGLWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Clon 7 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLLEESGGDLVKPGGTLTVTCKASGFSFSN  
NGICWVRQAPGKGLEWIGCLYVGSSDTTYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQ  
 MSLTVADTATYFCTINLGLWGPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSS  
 TVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTS  
 SSQPVTNCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDT  
 LMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRV  
 VSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPP  
 REELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSYFL  
 YSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 4)

Clon 7 VH CDR1 AA

GFSFSNN (SEQ ID NO: 5)

Clon 7 VH CDR2 AA

YVGSSD (SEQ ID NO: 6)

Clon 7 VH CDR3 AA

NLGL (SEQ ID NO: 7)

Clon 7 ADN VL

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCT  
 CCCAGGTGCCACATTTGCCATCGTGGTGACCCAGACTCCATCTTCCAAGT  
 CTGTCCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAG  
 TGTTTATAATAGCGACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAG  
 CCTCCCAAGCAACTGATCTATGCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCC  
 ATCGCGCTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATC  
 AGCGATGTGGTGTGTGACGATGCTGCCACTTATTATTGTGCAGGATATAA  
 AAGTAGTAGTACTGATGGGATTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTG  
 GTCAAA (SEQ ID NO: 8)

Clon 7 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVY  
NSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASTLASGVPSRFRKSGSGTQFTLTISDVV  
 CDDAATYYCAGYKSSSTDGIAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 9)

Clon 7 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVY  
 NSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAAS<sup>1</sup>TLASGVPSR<sup>2</sup>FKGSGSGTQFTLTISDVV  
 5 CDDAATYYCAGYKSSSTDGIAFGGGTEVVVKGDPVAPT<sup>3</sup>VLIFPPAADQVAT  
 GTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLT  
 10 LTSTQYN<sup>4</sup>SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 10)

Clon 7 VL CDR1 AA  
 QASESVYNSDWLA (SEQ ID NO: 11)  
 Clon 7 VL CDR2 AA  
 AASTLAS (SEQ ID NO: 12)  
 15 Clon 7 VL CDR3 AA  
 AGYKSSSTDGIA (SEQ ID NO: 13)  
 Clon 13 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGT  
 20 CCAGTGTCAAGGAGCAGCTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCT  
 GGAGGAACCCTGACAGTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTA  
 25 ACAATGGAATTTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG  
 GATCGGATGTCTTTATGTTGGTAGTAGTGATACCACTTACTACGCGAGCT  
 30 GGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAAGCTCGTCGACCACGGTGAC  
 TCTACAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGA  
 CGATAAATCTCGGCTTGTGGGGCCCCCGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA  
 35 (SEQ ID NO: 14)

Clon 13 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQE<sup>5</sup>QLEESGGDLVKPGGTLVTCKASG<sup>6</sup>FSFSN  
 40 NGICWVRQAPGKGLEWIGCLYVGSSD<sup>7</sup>TTYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQ  
 MTS<sup>8</sup>LTVADTATYFCTINLGLWGPGLVTVSS (SEQ ID NO: 15)

Clon 13 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQE<sup>9</sup>QLEESGGDLVKPGGTLVTCKASG<sup>10</sup>FSFSN  
 50 NGICWVRQAPGKGLEWIGCLYVGSSD<sup>11</sup>TTYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQ  
 MTS<sup>12</sup>LTVADTATYFCTINLGLWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDT<sup>13</sup>PSS  
 TVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGV<sup>14</sup>RTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTS  
 55 SSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDT  
 LMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQV<sup>15</sup>RTARPPLREQQFNSTIRV  
 VSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPP  
 60 REELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDS<sup>16</sup>DGSYFL  
 YSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO:  
 65 16)

Clon 13 VH CDR1 AA  
 GFSFSNN (SEQ ID NO: 5)  
Clon 13 VH CDR2 AA  
 YVGSSD (SEQ ID NO: 6)  
Clon 13 VH CDR3 AA  
Clon 13 VL ADN

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCT  
 CCCAGGTGCCACACTTGCCATCGTGGTGACCCAGACTCCATCTTCCAAGT  
 CTGTCCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAG  
 TGTTTATAATAGCGACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGGCAG  
 CCTCCCAAGCAACTGATCTATGCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCC  
 ATCGCGCTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCTCACCATC

Clon 13 VL AA (CDR subayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVY  
 NSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASLASGVPSRFRKGS GSGTQFTLTISDVV  
 CDDAATYYCAGYKSSSTDGIAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 18)

Clon 13 LC AA (CDR subayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVY  
 NSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASLASGVPSRFRKGS GSGTQFTLTISDVV  
 CDDAATYYCAGYKSSSTDGIAFGGGTEVVVKGDPVAPT VLIFFPAADQVAT  
 GTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLT  
 LTSTQYN SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 19)

Clon 13 VL CDR1 AA  
 QASESVYNSDWLA (SEQ ID NO: 11)  
Clon 13 VL CDR2 AA  
 AASTLAS (SEQ ID NO: 12)  
Clon 13 VL CDR3 AA  
 AGYKSSSTDGIA (SEQ ID NO: 13)  
Clon 14-1 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGT  
 CCAGTGT CAGGAGCAGCTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCT  
 GGGGCATCCCTGACACTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTGACTTCAGTAT  
 CAACTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTTGGAG  
 TGGATCGCATGCATTTATACTGGTGATGATGACACTTTCTACGCGAGCTG  
 GGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACT  
 CTACAACTGAACAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGT



MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVY  
NSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASTLASGVPSRFRKGS<sup>5</sup>SGSGTQFTLTISDVV  
 CDDAATYYCAGYKSSSTDGIAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 18)

Clon 14-1 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQL<sup>10</sup>EESGGGLVKPGASLTLTCKASGFD<sup>15</sup>FSIN  
 YYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGD<sup>20</sup>DDTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQL  
 NSLTAADTATYFCVRGLYSGSINNLWGPGLVTVSS (SEQ ID NO: 21)

Clon 14-1 HC AA (CDR subrayadas) ID NO: 22)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQL<sup>20</sup>EESGGGLVKPGASLTLTCKASGFD<sup>25</sup>FSIN  
 YYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGD<sup>30</sup>DDTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQL  
 NSLTAADTATYFCVRGLYSGSINNLWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCG  
 DTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSV  
 VSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPP  
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQF  
 NSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKV  
 YTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDS  
 DGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ  
 ID NO: 22)

Clon 14-1 VH CDR1 AA

GFD<sup>40</sup>FSIN<sup>45</sup>Y (SEQ ID NO: 23)

Clon 14-1 VH CDR2 AA

YTGD<sup>50</sup>D (SEQ ID NO: 24)

Clon 14-1 VH CDR3 AA

GLYSGSINNL (SEQ ID NO: 25)

Clon 14-1 VL ADN

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCT  
 CCCAGATGCCAGATGTGCGCTTGTGATGACCCAGACTCCATCCCCTGTGT  
 CTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAGTTGCCAGGCCAGTCAGAG  
 TGTTTATAACAACGACTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAG  
 CCTCCCAA<sup>55</sup>ACTCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTC  
 ATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATC  
 AGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCGCTTACTATTGTGCAGGCGTTA  
 AAGGTTATAGTAATGATAATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGT  
 GGTCAAA (SEQ ID NO: 26)

Clon 14-1 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGT<sup>VT</sup>ISCQASQSV  
 YNNDYLSWYQQKPGQPPKLLIYYASTLASGVSSRFKGS<sup>GS</sup>GTQFTLTISDVQ  
 5 CDDAAAYYCAGVKGYSDNNGFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 27)

Clon 14-1 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGT<sup>VT</sup>ISCQASQSV  
 10 YNNDYLSWYQQKPGQPPKLLIYYASTLASGVSSRFKGS<sup>GS</sup>GTQFTLTISDVQ  
 CDDAAAYYCAGVKGYSDNNGFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVA  
 15 TGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTL  
 TLTSTQYN<sup>SH</sup>KEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO:28)

Clon 14-1 VLCDR1 AA

QASQSVYNNDYLS (SEQ ID NO: 29)

Clon 14-1 VL CDR2 AA

YASTLAS (SEQ ID NO: 30)

Clon 14-1 VL CDR3 AA

AGVKGYSDNNG (SEQ ID NO: 31)

Clon 14-7 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGT  
 CCAATGTCAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGG  
 30 GCATCCCTGACACTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTCGACTTCAGTATCAA  
 CTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTTGGAGTGG  
 35 ATCGCATGCATTTATACTGGTGATGATGACACTTTCTACGCGAGCTGGGC  
 GAAAGGCCCGGTTACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTA  
 40 CAACTGAACAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGTGA  
 GAGGTCTATATAGTGGTAGTATTAATAACCTGTGGGGCCCAGGCACCCT  
 GGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 32)

Clon 14-7 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLT<sup>LT</sup>CKASGFDESINY  
 50 YMCWVRQAPGKGLEW<sup>IA</sup>CIYTGD<sup>DD</sup>DTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLN  
 SLTAADTATYFCVRGLYSGSINN<sup>L</sup>WGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)

Clon 14-7 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCKASGFDFSINY  
 YMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDDDTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLN  
 5 SLTAADTATYFCVRGLYSGSINNLWGPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGD  
 TPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVV  
 10 SVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNS  
 TIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYT  
 15 MGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGD  
 SYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID  
 20 NO: 34)

Clon 14-7 VH CDR1 AA  
 GFDFSINY (SEQ ID NO: 23)  
Clon 14-7 VH CDR2 AA  
 25 YTGDD (SEQ ID NO: 24)  
Clon 14-7 VH CDR3 AA  
 GLYSGSINN (SEQ ID NO: 25)  
Clon 14-7 VL ADN

30 ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCT  
 CCCAGATGCCAGATGTGCGCTTGTGATGACCCAGACTCCATCCCCTGTGT  
 35 CTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAGTTGCCAGGCCAGTCAGAG  
 TGTTTATAACAACGACTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAG  
 CCTCCCAAACCTCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTC  
 40 ATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATC  
 AGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCGCTTACTATTGTGCAGGCGTTA  
 45 AAGGTTATAGTAATGATAATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGT  
 GGTCAAA (SEQ ID NO: 35)

Clon 14-7 VL AA (CDR subrayadas)

50 MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQASQSV  
YNNDYLSWYQQKPGQPPKLLIYASTLASGVSSRFKGS GSGTQFTLTISDVQ  
 55 CDDAAAYYCAGVKGYSDNNNGFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 36)

Clon 14-7 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGT<sup>5</sup>VTISCQASQSV  
YNNDYLSWYQQKPGQPPKLLIYYASTLASGVSSRFKGS<sup>10</sup>SGTQFTLTISDVQ  
CDDAAAYYCAGVKGYSNDNNGFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVA  
TGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTL  
TLTSTQYN<sup>15</sup>SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 37)

Clon 14-7 VL CDR1 AA  
QASQSVYNNDYLS (SEQ ID NO: 29)  
Clon 14-7 VL CDR2 AA  
YASTLAS (SEQ ID NO: 30)  
Clon 14-7 VL CDR3 AA  
AGVKGYSNDNNG (SEQ ID NO: 31)  
Clon 15 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGGGT<sup>20</sup>  
CCAGTGTCAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGG  
GCATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCACGAGCAA  
CTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG<sup>25</sup>  
GTCGCGTGCATTTTTCTTGGTAGTAGTGGTAACACTGTCTACGCGAACTG  
GGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACT<sup>30</sup>  
CTGCAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGC  
GAGAGACTATGTTAATGGTTATGACTACTTTAACTTGTGGGGGCCCAGGCA  
CCTTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 38)<sup>35</sup>

Clon 15 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFTSNY<sup>40</sup>  
YMCWVRQAPGKGLEWVACIFLGSSGNTVYANWAKGRFTISKTSSTTVTLQ  
MTSLTVADTATYFCARDYVNGYDYFNLWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 39)

Clon 15 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFTSNY<sup>45</sup>  
YMCWVRQAPGKGLEWVACIFLGSSGNTVYANWAKGRFTISKTSSTTVTLQ  
MTSLTVADTATYFCARDYVNGYDYFNLWGPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAP<sup>50</sup>  
CCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSL  
SSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI<sup>55</sup>  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQ  
QFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPK<sup>60</sup>  
VYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLD  
SDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ  
ID NO: 40)<sup>65</sup>

Clon 15 VH CDR1 AA

GFSFTSNY (SEQ ID NO: 41)

Clon 15 VH CDR2 AA

5 FLGSSG (SEQ ID NO: 42)

Clon 15 VH CDR3 AA

DYVNGYDYFNL (SEQ ID NO: 43)

Clon 15 VL ADN

10 ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCT  
 CCCAGGTGCCACATTTGCCCAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCCGTGT  
 CTGCGGCTGTTGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTCAGAG  
 15 TGTTTATAATAAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCT  
 CCCAAAGGCCTGATCTATTCTACATCGACTCTAGATTCTGGGGTCCCATC  
 20 GCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCTCACCATCAGC  
 GACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGA  
 TTGTAGTAGTGCTGATTGTAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTG  
 25 GTCAAA (SEQ ID NO: 44)

Clon 15 VL AA (CDR subayadas)

30 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTASPVSAAVGGTVTINCQSSQSV  
YNKNLAWYQQKPGQPPKGLIYSTSTLDSGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQC  
 DDAATYYCLGSYDCSSADCNAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 45)

Clon 15 LC AA (CDR subayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTASPVSAAVGGTVTINCQSSQSV  
 40 YNKNLAWYQQKPGQPPKGLIYSTSTLDSGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQC  
 DDAATYYCLGSYDCSSADCNAFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVAT  
 GTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLT  
 45 LTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 46)

Clon 15 VL CDR1 AA

QSSQSVYNKNLA (SEQ ID NO: 47)

Clon 15 VL CDR2 AA

50 STSTLDS (SEQ ID NO: 48)

Clon 15 VL CDR3 AA

LGSYDCSSADCNA (SEQ ID NO: 49)

Clon 17 VH ADN

55

60

65

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGT  
 CCAATGTCAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGG  
 5 GCATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGACAG  
 TTGGTACTTGTGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG  
 ATCGCATGCATTTATACTGGTGATGGTGACACTTATTACGCGACCTGGGC  
 10 GAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAGACCTCGTCGACCACAGTGACTCTA  
 CAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGA  
 15 GGGGTGCCCAATTTTACTTGTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCC  
 TCA (SEQ ID NO: 50)

Clon 17 VH AA (CDR subrayadas)

20 METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCTASGFSFSDSW  
 YLCWVRQAPGKGLEWIACIYTDGDTYATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMT  
 25 SLTAADTATYFCARGAQFYLWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 51)

Clon 17 HC AA (CDR subrayadas)

30 METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCTASGFSFSDSW  
 YLCWVRQAPGKGLEWIACIYTDGDTYATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMT  
 SLTAADTATYFCARGAQFYLWGQGTLLTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPS  
 35 STVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVT  
 SSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIR  
 40 VVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGP  
 PREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGDSYF  
 45 LYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO:  
 52)

Clon 17 VH CDR1 AA

GFSFSDSW (SEQ ID NO: 53)

Clon 17 VH CDR2 AA

YTDG (SEQ ID NO: 54)

Clon 17 VH CDR3 AA

GAQFYL (SEQ ID NO: 55)

Clon 17 VL ADN

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCT  
 CCCAGGTGCCACATTTGCCCAGGTGCTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGT  
 5 CTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTCAGAG  
 TGTTTATGCCAACACCTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGC  
 10 CTCCAAGCAACTGATCTATTCTGCATCCAGTCTGGCATCTGGGGTCCCA  
 CCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCGCTCTCACCATCA  
 GCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGATAT  
 15 AGTTGTGGTCTTGCTGATTGTGCTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGT  
 GGTCAAA (SEQ ID NO:56)

Clon 17 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGGT VTINCQSSQSV  
YANTYLSWYQQKPGQPPKQLIYSASSLASGVPPRFKGS GSGTQFALTISDVQ  
 25 CDDAATYYCLGRYSCGLADCAAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 57)

Clon 17 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGGT VTINCQSSQSV  
YANTYLSWYQQKPGQPPKQLIYSASSLASGVPPRFKGS GSGTQFALTISDVQ  
 30 CDDAATYYCLGRYSCGLADCAAFGGGTEVVVKGDPVAPT VLIFFPAADQV  
 35 ATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQT TGIENSKTPQNSADCTYNLSS  
 TLTLTSTQYN SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 58)

Clon 17 VL CDR1 AA

QSSQSVYANTYLS (SEQ ID NO: 59)

Clon 17 VL CDR2 AA

SASSLAS (SEQ ID NO: 60)

Clon 17 VL CDR3 AA

LGRYSCGLADCAA (SEQ ID NO: 61)

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación son anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación comprenden por lo menos una CDR expuesta en las Figuras 5-21. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona hibridomas capaces de producir los anticuerpos divulgados en la presente, y también métodos de producción de anticuerpos a partir de hibridomas, como se describe en la presente y como se conoce en la técnica.

En la presente se describen anticuerpos humanizados y pueden prepararse mediante técnicas conocidas. En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende el dominio variable de un anticuerpo murino o de conejo (o la totalidad o parte del sitio de unión a antígeno del mismo) y un dominio constante derivado de un anticuerpo humano. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal murino o de conejo y un fragmento de dominio variable (que carece del sitio de unión a antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales manipulados incluyen los descritos en Riechmann et al., (1988) Nature 332:323; Liu et al., (1987) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439; Larrick et al., (1989) Bio/Technology 7:934; y Winter et al., (1993) TIPS 14:139. En algunas realizaciones, el anticuerpo quimérico es un anticuerpo injertado con CDR. Las técnicas para humanizar anticuerpos se analizan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.869.619; 5.225.539; 5.821.337; 5.859.205; 6.881.557; Padlan et al., (1995) FASEB J. 9:133-39; Tamura et al., (2000) J. Immunol. 164:1432-41; Zhang et al., (2005) Mol. Immunol. 42(12):1445-1451; Hwang et al., Methods. (2005) 36(1):35-42; Dall'Acqua et al., (2005) Methods 36(1):43-60; y Clark, (2000) Immunology Today 21(8):397-402.

Una molécula de unión a antígeno de la presente enseñanza también puede ser un anticuerpo monoclonal completamente humano. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos pueden generarse mediante cualquiera de una serie de técnicas con las que estarán familiarizados los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen, entre otros, la transformación por el virus de Epstein Barr (VEB) de células de sangre periférica humana (por ejemplo, que contengan linfocitos B), la inmunización *in vitro* de células B humanas, la fusión de células de bazo de ratones transgénicos inmunizados portadores de genes de inmunoglobulina humana insertados, el aislamiento a partir de bibliotecas de fagos de la región V de inmunoglobulina humana, u otros procedimientos conocidos en la técnica y basados en la presente divulgación.

Se han desarrollado procedimientos para generar anticuerpos monoclonales humanos en animales no humanos. Por ejemplo, se han preparado ratones en los que uno o más genes de inmunoglobulina endógena han sido inactivados mediante una variedad de medios. Se han introducido genes de inmunoglobulina humana en los ratones para sustituir a los genes de ratón inactivados. En esta técnica, se introducen elementos del locus de las cadenas pesadas y ligeras humanas en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los loci de las cadenas pesadas y ligeras endógenas (véase también Bruggemann et al., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58).

Ejemplos de técnicas de producción y uso de animales transgénicos para la producción de anticuerpos humanos o parcialmente humanos se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.814.318, 5.569.825, y 5.545.806; Davis et al., Antibody Engineering: Methods and Protocols, (Lo, ed) Humana Press, NJ, 191-200 (2003); Kellermann et al., (2002) Curr Opin Biotechnol. 13:593-97; Russel et al., (2000) Infect Immun. 68:1820-26; Gallo et al., (2000) Eur J. Immun. 30:534-40; Davis et al., (1999) Cancer Metastasis Rev. 18:421-25; Green, (1999) J Immunol Methods 231:11-23; Jakobovits, (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 31:33-42; Green et al., (1998) J Exp Med. 188:483-95; Jakobovits, (1998) Exp. Opin. Invest. Drugs. 7:607-14; Tsuda et al., (1997) Genomics, 42:413-21; Mendez et al., (1997) Nat. Genet. 15:146-56; Jakobovits, (1994) Curr Biol. 4:761-63; Arbones et al., (1994) Immunity 1:247-60; Green et al., (1994) Nat. Genet. 7:13-21; Jakobovits et al., (1993) Nature 362:255-58; Jakobovits et al., (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:2551-55; Chen et al., (1993) Intl Immunol 5:647-656; Choi et al., (1993) Nature Genetics 4:117-23; Fishwild et al., (1996) Nature Biotechnology 14:845-51; Lonberg et al., (1994) Nature 368: 856-59; Lonberg, (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Neuberger, (1996) Nature Biotech 14:826; Taylor et al., (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-95; Taylor et al., (1994) Intl Immunol 6:579-91; Tomizuka et al., (1997) Nature Genetics 16:133-43; Tomizuka et al., (2000) Proc Nat Acad Sci USA 97:722-27; Tuailon et al., (1993) Proc Nat Acad Sci USA 90:3720-24; Tuailon et al., (1994) J Immunol 152:2912-20.; Lonberg et al., (1994) Nature 368:856; Taylor et al., (1994) Intl Immunol 6:579; Patente de Estados Unidos N° 5,877,397; Bruggemann et al., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58; Jakobovits et al., (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:525-35.

Un método adicional para obtener moléculas de unión a antígeno de la enseñanza es mediante el uso de presentación en fagos, que está bien establecido para este propósito. Véase, por ejemplo, Winter et al., (1994) Ann. Rev. Immunol. 12:433-55; Burton et al., (1994) Adv. Immunol 57:191-280. Pueden crearse bibliotecas combinatorias de genes de región variable de inmunoglobulina humana o murina en vectores de fago que pueden cribarse para seleccionar fragmentos de Ig (Fab, Fv, sFv, o multímeros de los mismos) que se unen al scFv FMC63 anti-CD19, así como moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan dichas moléculas. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Huse et al., (1989) Science 246:1275-81; Sastry et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-32; Altling-Mees et al., (1990) Strategies in Molecular Biology 3:1-9; Kang et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-66; Hoogenboom et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:381-388; Schlebusch et al., (1997) Hybridoma 16:47-52 y las referencias citadas en los mismos. Por ejemplo, puede insertarse una biblioteca que contiene una pluralidad de secuencias de polinucleótidos que codifican fragmentos de región variable de Ig en el genoma de un bacteriófago filamentoso, como el fago M13 o el fago lambda (en este enfoque también pueden usarse los vectores  $\lambda$ ImmunoZap™ (H) y  $\lambda$ ImmunoZap™ (L) (Stratagene, La Jolla, Calif)) o una variante de los mismos, en marco con la secuencia que codifica una proteína de cubierta del fago.

Brevemente, el ARNm se aísla de una población de células B y se usa para crear bibliotecas de expresión de ADNc de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera en los vectores  $\lambda$ ImmunoZap™ (H) y  $\lambda$ ImmunoZap™ (L). Estos vectores pueden cribarse individualmente o coexpresarse para formar fragmentos Fab o anticuerpos. Las placas positivas pueden convertirse posteriormente en un plásmido no lítico que permite la expresión de alto nivel de fragmentos de anticuerpos monoclonales de *E. coli*.

En algunas realizaciones, en un hibridoma las regiones variables de un gen que expresa un anticuerpo monoclonal de interés se amplifican usando cebadores de nucleótidos. Estos cebadores pueden ser sintetizados por un experto en la técnica, o pueden adquirirse de fuentes comerciales, que también venden cebadores para regiones variables de ratón y humanas incluyendo, entre otros, cebadores para regiones V<sub>H</sub>, V<sub>Hb</sub>, V<sub>Hc</sub>, V<sub>Hd</sub>, C<sub>H1</sub>, V<sub>L</sub> y C<sub>L</sub>). Estos cebadores pueden usarse para amplificar regiones variables de cadena pesada o ligera, que luego pueden insertarse en vectores como  $\lambda$ ImmunoZap™ (H) y  $\lambda$ ImmunoZap™ (L) (Stratagene), respectivamente. A continuación, estos vectores pueden introducirse en *E. coli*, levadura o sistemas basados en mamíferos para su expresión. Con estos métodos pueden producirse grandes cantidades de una proteína de cadena sencilla que contenga una fusión de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>.



Una vez que se han obtenido las células productoras de las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en la presente usando cualquiera de las técnicas de inmunización y otras técnicas descritas anteriormente, pueden clonarse los genes de anticuerpos específicos aislando y amplificando el ADN o ARNm de los mismos de acuerdo con los procedimientos estándar descritos en la presente. Los anticuerpos producidos a partir de los mismos pueden secuenciarse e identificarse las CDR, y puede manipularse el ADN que codifica las CDR como se ha descrito anteriormente para generar otros anticuerpos de acuerdo con la enseñanza.

Un experto en la técnica entenderá que algunas proteínas, como los anticuerpos, pueden experimentar una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones a menudo dependen de la línea celular huésped usada para expresar la proteína, así como de las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de diketopiperizina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico terminal carboxi (como la lisina o la arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, (1995) J Chromatog 705:129-34.

Un método alternativo para la producción de un anticuerpo monoclonal murino (del que puede derivarse FMC63) es inyectar las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un ratón singénico, por ejemplo, un ratón que ha sido tratado (por ejemplo, cebado con pristano) para promover la formación de líquido de ascitis que contiene el anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse mediante una amplia variedad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína-A Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Baines y Thorpe, (1992) en Methods in Molecular Biology, 10:79-104 (The Humana Press). Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad usando un ligando adecuado seleccionado sobre la base de las propiedades particulares del anticuerpo (por ejemplo, isotipo de cadena pesada o ligera, especificidad de unión, etc.). Entre los ejemplos de un ligando adecuado, inmovilizado en un soporte sólido, se incluyen la proteína A, la proteína G, un anticuerpo de región anticonstante (cadena ligera o cadena pesada) y un anticuerpo antiidiotipo.

Aunque las moléculas de unión a antígeno divulgadas se produjeron en un sistema de conejo, para muchas aplicaciones pueden ser adecuados los anticuerpos humanos, parcialmente humanos o humanizados, particularmente aquellas que implican la administración del anticuerpo a un sujeto humano, otros tipos de moléculas de unión a antígeno serán adecuados para ciertas aplicaciones. Tales anticuerpos pueden prepararse como se describe en la presente y constituyen un aspecto de la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona moléculas de unión a antígeno que se unen específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan tales moléculas. Moléculas de unión a antígeno que compiten de manera cruzada con las moléculas de unión a antígeno divulgadas en la presente para un aspecto de la divulgación. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a antígeno compite de manera cruzada con un anticuerpo de referencia que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-60. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a antígeno compite de manera cruzada con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende una VH CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 23, 41 y 53. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a antígeno compite de manera cruzada con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende una VH CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 24, 42 y 54. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a antígeno compite de manera cruzada con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende una VH CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 25, 43 y 55. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a antígeno compite de manera cruzada con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende una CDR1 VL que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11, 29, 47 y 59. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a antígeno compite de manera cruzada con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende una VL CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12, 30, 48 y 60. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a antígeno compite de manera cruzada con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende una VL CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13, 31, 49 y 61.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la presente enseñanza codifican un anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), así como moléculas que comprenden estas secuencias y células que presentan tales moléculas, en donde el anticuerpo o molécula de unión a antígeno se une al mismo epítipo o a un epítipo solapado como un anticuerpo de referencia divulgado en la presente (por ejemplo, los que comprenden secuencias presentadas en las Figuras 5-21). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno se une al mismo epítipo o a un epítipo solapado que un anticuerpo de referencia.

## II.A. Clon 7

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv

FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFSFNN (SEQ ID NO: 5).

5 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YVGSSD (SEQ ID NO: 6).

10 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos NLGL (SEQ ID NO: 7).

15 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH de cadena pesada que comprende: (a) una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFSFNN (SEQ ID NO: 5); y/o (b) una VH CDR2 que comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YVGSSD (SEQ ID NO: 6); y/o (c) una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos NLGL (SEQ ID NO: 7).

25 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan esta secuencia, comprenden una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3, en donde la VH CDR1, la VH CDR2 y la VH CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 presentadas en las FIGURAS 5, 19, 20 y 21. En una realización particular, las VH CDR son las presentadas en la FIGURA 5.

30 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 5 (SEQ ID NO: 3).

35 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) VH descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VH como se expone en, o se derivan de, las secuencias presentadas en la FIGURA 5 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 5).

40 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 en la FIGURA 5). En algunas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En varias realizaciones, la región variable de cadena pesada es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:3.

50 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QASESVYNSDWLA (SEQ ID NO: 11).

55 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AASTLAS (SEQ ID NO: 12).

60 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGYKSSTDGIA (SEQ ID NO: 13).

65 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv

FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL de cadena ligera que comprende: (a) una VL CDR1 que comprende, consiste o comprende esencialmente en la secuencia de aminoácidos QASESVYNSDWLA (SEQ ID NO: 11); y/o (b) una VL CDR2 que comprende, consiste o comprende esencialmente en la secuencia de aminoácidos AASTLAS (SEQ ID NO: 12); y/o (c) una VL CDR3 que comprende, consiste o comprende esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGYKSSSTDGIA (SEQ ID NO: 13).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan esta secuencia, comprenden una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3, en donde la VL CDR1, la VL CDR2 y la VL CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 presentadas en las FIGURAS 6, 19, 20 y 21. En una realización particular, las VL CDR son las presentadas en la FIGURA 6.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 6 (SEQ ID NO: 9).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) VL descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VL como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 6 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 6).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 10 en la FIGURA 6). En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

En varias realizaciones, la región variable de cadena ligera es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una, dos y/o tres secuencias VH CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una VH CDR1, una VH CDR2, y una VH CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquier VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 divulgadas en la presente, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una, dos y/o tres secuencias VL CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 divulgadas en la presente, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; (b) una región VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (c) una región VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; (d) una región VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; (e) una región VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; y (f) una región VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1; (b) una región VH CDR2; (c) una región VH CDR3; (d) una región VL CDR1; (e) una región VL CDR2; y (f) una región VL CDR3, en donde las VH y VL CDR se muestran en las FIGURAS 5, 6, respectivamente, y en las FIGURAS 19, 20 y 21.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 5) y una secuencia de región variable de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 6).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una región variable

de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. Las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se proporcionan en las FIGURAS 5 y 6, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 5) y una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 6).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

## **II.B. Clon 13**

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFSFNN (SEQ ID NO: 5).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YVGSSD (SEQ ID NO: 6).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos NLGL (SEQ ID NO: 7).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH de cadena pesada que comprende: (a) una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFSFNN (SEQ ID NO: 5); y/o (b) una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YVGSSD (SEQ ID NO: 6); y/o (c) una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos NLGL (SEQ ID NO: 7).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan esta secuencia, comprende una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3, en donde la VH CDR1, la VH CDR2 y la VH CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 presentadas en las FIGURAS 7, 19, 20 y 21. En una realización particular, las VH CDR son las presentadas en la FIGURA 7.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 7 (SEQ ID NO: 15).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VH descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VH como se expone en, o se puede derivar de, las secuencias presentadas en la FIGURA 7 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 7).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 16

en la FIGURA 7). En algunas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

En varias realizaciones, la región variable de cadena pesada es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:15.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QASESVYNSDWLA (SEQ ID NO: 11).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AASTLAS (SEQ ID NO: 12).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGYKSSTDGIA (SEQ ID NO: 13).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL de cadena ligera que comprende: (a) una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QASESVYNSDWLA (SEQ ID NO: 11); y/o (b) una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AASTLAS (SEQ ID NO: 12); y/o (c) una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGYKSSTDGIA (SEQ ID NO: 13).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan esta secuencia, comprenden una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3, en donde la VL CDR1, la VL CDR2, y la VL CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 presentadas en las FIGURAS 8, 19, 20 y 21. En una realización particular, las VL CDR son las presentadas en la FIGURA 8.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 8 (SEQ ID NO: 18).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VL descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VL como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 8 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 8).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 19 en la FIGURA 8). En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

En varias realizaciones, la región variable de cadena ligera es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una, dos y/o tres secuencias VH CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una VH CDR1, una VH CDR2, y una VH CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquier VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 divulgada en la presente, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una, dos y/o tres secuencias VL CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 divulgadas en la presente, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; (b) una región VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (c) una región VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; (d) una región VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; (e) una región VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; y (f) una región VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1; (b) una región VH CDR2; (c) una región VH CDR3; (d) una región VL CDR1; (e) una región VL CDR2; y (f) una región VL CDR3, en donde las VH y VL CDR se muestran en las FIGURAS 7, 8, respectivamente, y en las FIGURAS 19, 20 y 21.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 7) y una secuencia de región variable de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 8).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18. Las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se proporcionan en las FIGURAS 7 y 8, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 7) y una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 8).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

## **II.C. Clon 14-1**

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFDFSINY (SEQ ID NO: 23).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YTGDD (SEQ ID NO: 24).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GLYSGSINNL (SEQ ID NO: 25).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH de cadena pesada que comprende: (a) una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFDFSINY (SEQ ID NO: 23); y/o (b) una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YTGDD (SEQ ID NO: 24); y/o (c) una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GLYSGSINNL (SEQ

ID NO: 25).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan esta secuencia, comprenden una VH CDR1, una VH CDR2, y una VH CDR3, en donde la VH CDR1, la VH CDR2, y la VH CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 presentadas en las FIGURAS 19, 20, y 21. En una realización particular, las VH CDR son las presentadas en la FIGURA 9.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 9 (SEQ ID NO: 21).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VH descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VH como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 9 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 9).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 22 en la FIGURA 9). En algunas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En varias realizaciones, la región variable de cadena pesada es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:21.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QASQSVYNN DYLS (SEQ ID NO: 29).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YASTLAS (SEQ ID NO: 30).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGVKGYSNDNNG (SEQ ID NO: 31).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL de cadena ligera que comprende: (a) una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QASQSVYNN DYLS (SEQ ID NO: 29); y/o (b) una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YASTLAS (SEQ ID NO: 30); y/o (c) una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGVKGYSNDNNG (SEQ ID NO: 31).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una VL CDR1, una VL CDR2, y VL CDR3, en donde la VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 presentadas en las FIGURAS 19, 20 y 21. En una realización particular, las VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 son las presentadas en la FIGURA 10. En una realización particular, las VL CDR son las presentadas en la FIGURA 10.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 10 (SEQ ID NO: 27).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv

FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VL descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VL como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 10 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 10).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 28 en la FIGURA 10). En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

En varias realizaciones, la región variable de cadena ligera es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 27.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una, dos y/o tres secuencias VH CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una VH CDR1, una VH CDR2, y una VH CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquier VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 divulgadas en la presente, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una, dos y/o tres secuencias VL CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 divulgadas en la presente, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; (b) una región VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; (c) una región VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (d) una región VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; (e) una región VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30; y (f) una región VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1; (b) una región VH CDR2; (c) una región VH CDR3; (d) una región VL CDR1; (e) una región VL CDR2; y (f) una región VL CDR3, en donde las VH y VL CDR se muestran en las FIGURAS 9, 10, respectivamente, y en las FIGURAS 19, 20 y 21.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 9) y una secuencia de región variable de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 10).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28. Las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se proporcionan en las FIGURAS 9 y 10, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se proporcionan en las FIGURAS 9 y 10, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 9) y una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 10).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a



la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.

#### **II.D. Clon 14-7**

- 5 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFDFSINY (SEQ ID NO: 23).
- 10 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YTGDD (SEQ ID NO: 24).
- 15 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GLYSGSINNL (SEQ ID NO: 25).
- 20 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH de cadena pesada que comprende: (a) una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFDFSINY (SEQ ID NO: 23); y/o (b) una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YTGDD (SEQ ID NO: 24); y/o (c) una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GLYSGSINNL (SEQ ID NO: 25).
- 25 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan esta secuencia, comprenden una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3, en donde la VH CDR1, la VH CDR2 y la VH CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 presentadas en las FIGURAS 19, 20 y 21. En una realización particular, las VH CDR son las presentadas en la FIGURA 11.
- 30 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 11 (SEQ ID NO: 33).
- 35 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VH descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VH como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 11 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 11).
- 40 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 11). En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33.
- 45 En varias realizaciones, la región variable de cadena pesada es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 33.
- 50 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QASQSVYNNLYS (SEQ ID NO: 29).
- 55 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YASTLAS (SEQ ID NO: 30).
- 60 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YASTLAS (SEQ ID NO: 30).
- 65 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv

FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGVKGYSNDNNG (SEQ ID NO: 31).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL de cadena ligera que comprende: (a) una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QASQSVYNNDYLS (SEQ ID NO: 29); y/o (b) una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YASTLAS (SEQ ID NO: 30); y/o (c) una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGVKGYSNDNNG (SEQ ID NO: 31).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una VL CDR1, una VL CDR2, y VL CDR3, en donde la VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 presentadas en las FIGURAS 20, 21 y 22. En una realización particular, las VL CDR son las presentadas en la FIGURA 12.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 12 (SEQ ID NO: 36).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VL descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VL como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 12 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 12).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 37 en la FIGURA 12). En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36.

En varias realizaciones, la región variable de cadena ligera es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 36.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una, dos y/o tres secuencias VH CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una VH CDR1, una VH CDR2, y una VH CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquier VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 divulgada en la presente, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una, dos y/o tres secuencias VL CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 divulgadas en la presente, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; (b) una región VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; (c) una región VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (d) una región VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; (e) una región VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30; y (f) una región VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1; (b) una región VH CDR2; (c) una región VH CDR3; (d) una región VL CDR1; (e) una región VL CDR2; y (f) una región VL CDR3, en donde las VH y VL CDR se muestran en las FIGURAS 11, 12, respectivamente, y en las FIGURAS 19, 20 y 21.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan

esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 11) y una secuencia de región variable de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 12).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. Las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se proporcionan en las FIGURAS 11 y 12, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 11) y una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 12).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34; y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34; y (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

## **II.E. Clon 15 (15-7)**

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFSFTSNY (SEQ ID NO: 41).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos FLGSSG (SEQ ID NO: 42).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos DYVNGYDYFNL (SEQ ID NO: 43).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH de cadena pesada que comprende: (a) una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFSFTSNY (SEQ ID NO: 41); y/o (b) una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos FLGSSG (SEQ ID NO: 42); y/o (c) una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos DYVNGYDYFNL (SEQ ID NO: 43).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan esta secuencia, comprenden una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3, en donde la VH CDR1, la VH CDR2 y la VH CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 presentadas en las FIGURAS 19, 20 y 21. En una realización particular, las VH CDR son las presentadas en la FIGURA 13.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 13 (SEQ ID NO: 39).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VH descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VH como se expone en, o puede derivarse de, las

secuencias presentadas en la FIGURA 13 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 13).

5 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 40 en la FIGURA 13). En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39.

10 En varias realizaciones, la región variable de cadena pesada es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:39.

15 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QSSQSVYNKNLA (SEQ ID NO: 47).

20 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una CDR2 VL que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos STSTLDS (SEQ ID NO: 48).

25 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos LGSYDCSSADCNA (SEQ ID NO: 49).

30 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL de cadena ligera que comprende: (a) una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QSSQSVYNKNLA (SEQ ID NO: 47); y/o (b) una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos STSTLDS (SEQ ID NO: 48); y/o (c) una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos LGSYDCSSADCNA (SEQ ID NO: 49).

35 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una VL CDR1, una VL CDR2, y VL CDR3, en donde la VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 presentadas en las FIGURAS 19, 20 y 21. En una realización particular, las VL CDR son las presentadas en la FIGURA 14.

40 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 14 (SEQ ID NO: 45).

45 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VL descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VL como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 14 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 14).

50 En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 46 en la FIGURA 14). En algunas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45.

55 En varias realizaciones, la región variable de cadena ligera es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 45.

60 En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una, dos, y/o tres secuencias VH CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas

65

realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una VH CDR1, una VH CDR2, y una VH CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquier VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 divulgada en la presente, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una, dos y/o tres secuencias VL CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 divulgadas en la presente, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41; (b) una región VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; (c) una región VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; (d) una región VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47; (e) una región VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48; y (f) una región VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1; (b) una región VH CDR2; (c) una región VH CDR3; (d) una región VL CDR1; (e) una región VL CDR2; y (f) una región VL CDR3, donde las VH y VL CDR se muestran en las FIGURAS 13, 14, respectivamente, y en las FIGURAS 19, 20 y 21.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 13) y una secuencia de región variable de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 14).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45. Las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se proporcionan en las FIGURAS 13 y 14, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 13) y una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 14).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46.

## **II.F. Clon 17**

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFSFSDSW (SEQ ID NO: 53).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YTG DG (SEQ ID NO: 54).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GAQFY L (SEQ ID NO: 55).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VH de cadena pesada que comprende: (a) una VH CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos GFSFTSNY (SEQ ID NO: 53); y/o (b) una VH CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos FLGSSG (SEQ ID NO: 54); y/o (c) una VH CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos DYVNGYDYFNL (SEQ ID NO: 55).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), las moléculas que comprenden esta secuencia y las células que presentan esta secuencia, comprenden una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3, en donde la VH CDR1, la VH CDR2 y la VH CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 presentadas en las FIGURAS 19, 20 y 21. En una realización particular, las VH CDR son las presentadas en la FIGURA 15.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 15 (SEQ ID NO: 51).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VH descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VH como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 15 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 15).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 52 en la FIGURA 15). En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51.

En varias realizaciones, la región variable de cadena pesada es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 51.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QSSQSVYANTYLS (SEQ ID NO: 59).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SASSLAS (SEQ ID NO: 60).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos LGRYSCGLADCAA (SEQ ID NO: 61).

En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan tales moléculas, comprende una VL de cadena ligera que comprende: (a) una VL CDR1 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos QSSQSVYANTYLS (SEQ ID NO: 59); y/o (b) una VL CDR2 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SASSLAS (SEQ ID NO: 60); y/o (c) una VL CDR3 que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos LGRYSCGLADCAA (SEQ ID NO: 61).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una VL CDR1, una VL CDR2, y VL CDR3, en donde la VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las secuencias VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 presentadas en las FIGURAS 20, 21 y 22. En una realización particular, las VL CDR son las presentadas en la FIGURA 21.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv

FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la FIGURA 16 (SEQ ID NO: 57).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende las regiones marco (FR) de VL descritas en la presente. En realizaciones específicas, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende las FR de VL como se expone en, o puede derivarse de, las secuencias presentadas en la FIGURA 16 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las FR en una secuencia de la FIGURA 16).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 58 en la FIGURA 16). En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57.

En varias realizaciones, la región variable de cadena ligera es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 57.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una, dos y/o tres secuencias VH CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una VH CDR1, una VH CDR2, y una VH CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquier VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 divulgada en la presente, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende una, dos y/o tres secuencias VL CDR cualesquiera divulgadas en la presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 divulgadas en la presente, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; (b) una región VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54; (c) una región VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55; (d) una región VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59; (e) una región VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60; y (f) una región VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende: (a) una región VH CDR1; (b) una región VH CDR2; (c) una región VH CDR3; (d) una región VL CDR1; (e) una región VL CDR2; y (f) una región VL CDR3, en donde las VH y VL CDR se muestran en las FIGURAS 15, 16, respectivamente, y en las FIGURAS 19, 20 y 21.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 15) y una secuencia de región variable de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 16).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57. Las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se proporcionan en las FIGURAS 15 y 16, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a las moléculas que comprenden esta secuencia y a las células que presentan esta secuencia, comprende una secuencia de cadena pesada divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 15) y una secuencia de cadena ligera divulgada en la presente (por ejemplo, en la FIGURA 16).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión a antígeno comprende: (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; y (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58.

### **III Polinucleótidos que codifican anticuerpos y otras moléculas de unión a antígeno**

La presente enseñanza también está dirigida a polinucleótidos que codifican anticuerpos y otras moléculas de unión a antígeno que se unen específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a moléculas que comprenden esta secuencia y a células que presentan esta secuencia.

En algunas realizaciones, un polinucleótido de la presente enseñanza codifica una molécula de unión a antígeno, en donde la molécula de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 96%, por lo menos aproximadamente un 97%, por lo menos aproximadamente un 98%, por lo menos aproximadamente un 99%, o un 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 15, 21, 33, 39 y 51.

En algunas realizaciones, un polinucleótido de la presente enseñanza codifica una molécula de unión a antígeno, en donde la molécula de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable que es por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 96%, por lo menos aproximadamente un 97%, por lo menos aproximadamente un 98%, por lo menos aproximadamente un 99%, o un 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 18, 27, 36, 45 y 57.

En ciertas realizaciones, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 50. En otra realización, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 56.

Como apreciarán los expertos en la técnica, son posibles variaciones de las secuencias de polinucleótidos divulgadas debido a la degeneración del código genético. Tales variantes de las secuencias de polinucleótidos divulgadas forman por tanto un aspecto de la presente divulgación.

### **IV. Vectores, células y composiciones farmacéuticas**

En ciertos aspectos, en la presente se proporcionan vectores que comprenden un polinucleótido divulgado en la presente. En algunas realizaciones, la presente enseñanza se dirige a un vector o un conjunto de vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a moléculas que comprenden esta secuencia y a células que presentan esta secuencia, como se describe en la presente.

Para expresar los anticuerpos y otras moléculas de unión a antígeno de la presente enseñanza puede ser adecuado cualquier vector conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral. En algunas realizaciones, el vector es un vector retroviral, un vector de ADN, un vector del virus de la leucemia murina, un vector SFG, un plásmido, un vector de ARN, un vector adenoviral, un vector baculoviral, un vector viral de Epstein Barr, un vector papoviral, un vector viral de vaccinia, un vector viral de herpes simple, un vector asociado a adenovirus (AAV), un vector lentiviral, o cualquier combinación de los mismos.

En otros aspectos, en la presente se proporcionan células que comprenden un polinucleótido o un vector de la presente enseñanza. En algunas realizaciones, la presente enseñanza se dirige a células, células *in vitro*, que comprenden un polinucleótido que codifica una molécula de unión a antígeno, como se describe en la presente. En algunas realizaciones, la presente enseñanza se dirige a células, por ejemplo, células *in vitro*, que comprenden un polinucleótido que codifica un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a moléculas que comprenden esta secuencia y a células que presentan esta secuencia, como se describe en la presente.

Como célula huésped para los polinucleótidos y vectores que codifican todos o un fragmento de los anticuerpos y otras moléculas de unión a antígeno de la presente enseñanza puede usarse cualquier célula. En algunas realizaciones, una célula huésped puede ser una célula procariota, una célula fúngica, una célula de levadura, o células eucariotas superiores tales como una célula de mamífero. Las células procariotas adecuadas incluyen, sin



limitación, eubacterias, como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*; *Enterobacter*; *Erwinia*; *Klebsiella*; *Proteus*; *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*; *Bacilli* como *B. subtilis* y *B. licheniformis*; *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*; y *Streptomyces*. En algunas realizaciones, una célula huésped es una célula humana. En algunas realizaciones, una célula huésped es una célula CHO y en otras realizaciones una célula huésped es una célula sP2/0 u otra célula murina. Una célula huésped de la presente enseñanza puede obtenerse a través de cualquier fuente conocida en la técnica.

Otros aspectos de la presente enseñanza se dirigen a composiciones que comprenden un polinucleótido descrito en la presente, un vector descrito en la presente, un anticuerpo y/o una molécula de unión a antígeno descrita en la presente, o una célula *in vitro* descrita en la presente. En algunas realizaciones, la composición comprende un portador, diluyente, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición comprende un excipiente. En algunas realizaciones, la composición comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a moléculas que comprenden esta secuencia y a células que presentan esta secuencia. En otra realización, la composición comprende una molécula de unión a antígeno codificada por un polinucleótido de la presente enseñanza, en donde la molécula de unión a antígeno se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a moléculas que comprenden esta secuencia y a células que presentan esta secuencia, como se divulga en la presente. En otra realización, la composición comprende una célula *in vitro* que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno del mismo codificado por un polinucleótido de la presente enseñanza.

En algunas realizaciones, la composición comprende un anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a moléculas que comprenden esta secuencia y a células que presentan esta secuencia, como se divulga en la presente. En algunas realizaciones, la composición comprende más de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), a moléculas que comprenden esta secuencia y a células que presentan esta secuencia, como se divulga en la presente, en donde los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno se unen a más de un epítipo. En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno no compiten entre sí por la unión a dicho epítipo. En algunas realizaciones, dos o más de los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno proporcionados en la presente se combinan juntos en una composición farmacéutica. Preferiblemente, dicha composición será adecuada para su administración a un sujeto, incluyendo un humano.

## V. Métodos ejemplares

La siguiente sección describe varios métodos ejemplares de uso de las moléculas de unión a antígeno divulgadas en la presente. En los métodos divulgados puede emplearse cualquier molécula de unión a antígeno divulgada en la presente.

En varias realizaciones de los métodos divulgados, la molécula de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un scFv, un Fab, un Fab', un Fv, un F(ab')<sub>2</sub>, un dAb, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo de IgE, un anticuerpo de IgD, un anticuerpo de IgM, un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG1 que tenga por lo menos una mutación en la región bisagra, un anticuerpo de IgG2, un anticuerpo de IgG2 que tenga por lo menos una mutación en la región bisagra, un anticuerpo de IgG3, un anticuerpo de IgG1 que tenga por lo menos una mutación en la región bisagra, un anticuerpo de IgG4, un anticuerpo de IgG4 que tenga por lo menos una mutación en la región bisagra, un anticuerpo que comprenda por lo menos un aminoácido de origen no natural, y cualquier combinación de los mismos.

En algunos de los métodos divulgados pueden emplearse células T. Tales células pueden proceder de cualquier fuente conocida en la técnica. Por ejemplo, las células T pueden diferenciarse *in vitro* a partir de una población de células madre hematopoyéticas, o las células T pueden obtenerse de un sujeto. Las células T pueden obtenerse, por ejemplo, de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un foco de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. Además, las células T pueden derivarse de una o más líneas de células T disponibles en la técnica. Las células T también pueden obtenerse de una unidad de sangre extraída de un sujeto usando cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, como la separación FICOLL™ y/o aféresis. En la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2013/0287748 se divulgan métodos adicionales de aislamiento de células T para una terapia de células T.

En varias realizaciones de los métodos divulgados, una molécula de unión a antígeno se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), moléculas que comprenden esta secuencia y células que presentan esta secuencia, como se divulga en la presente. En realizaciones adicionales de los métodos divulgados, la molécula de unión a antígeno comprende una o más de (a) una CDR1 de cadena ligera, (b) una CDR2 de cadena ligera, (c) una CDR3 de cadena ligera, (d) una CDR1 de cadena pesada, (e) una CDR2 de cadena pesada, y (f) una CDR3 de cadena

pesada. En realizaciones adicionales de los métodos divulgados, una molécula de unión a antígeno comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende una de las SEQ ID NO: 7, 25, 43, 55, o una CDR3 de cadena ligera que comprende una de las SEQ ID NO: 13, 31, 49, 61, o ambas CDR3 de cadena pesada y ligera. En otras realizaciones de los métodos divulgados, la molécula de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una de las SEQ ID NO: 5, 23, 41 y 53, o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NO: 6, 24, 42 y 54, o una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NO: 11, 29, 47 y 59 o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NO: 12, 30, 48 y 60. En referencia a las Figuras, en varias realizaciones de los métodos divulgados, la molécula de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera, cada CDR comprendiendo una secuencia de aminoácidos mostrada en las FIGURAS 5-21.

En varias realizaciones de los métodos divulgados, una molécula de unión a antígeno comprende una cadena pesada (HC), y la HC comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (VH) que comprende una de las SEQ ID NO: 3, 15, 21, 33, 39 y 51. En referencia a las figuras, en varias realizaciones de los métodos divulgados, la cadena pesada comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada y una CDR3 de cadena pesada, cada CDR comprendiendo una secuencia de aminoácidos mostrada en las FIGURAS 5-21. Además, en realizaciones de los métodos divulgados, puede emplearse una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de VH que es por lo menos aproximadamente un 70%, por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 80%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 96%, por lo menos aproximadamente un 97%, por lo menos aproximadamente un 98%, por lo menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% idéntica a una VH de una molécula de unión a antígeno de la reivindicación divulgada en la presente (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia de región variable (VH) que comprende una de las SEQ ID NO: 3, 15, 21, 33, 39 y 51).

En varias realizaciones de los métodos divulgados, una molécula de unión a antígeno comprende una cadena ligera (LC), y la LC puede comprender una secuencia de región variable de cadena pesada (VL) que comprende una de las SEQ ID NO: 9, 18, 27, 36, 44 y 57. En referencia a las figuras, en varias realizaciones de los métodos divulgados, la cadena ligera comprende una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera y una CDR3 de cadena ligera, cada CDR comprendiendo una secuencia de aminoácidos mostrada en las FIGURAS 5-21. Además, en realizaciones de los métodos divulgados, puede emplearse una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos VL que es por lo menos aproximadamente un 70%, por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 80%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 96%, por lo menos aproximadamente un 97%, por lo menos aproximadamente un 98%, por lo menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% idéntica a una VL de una molécula de unión a antígeno de la reivindicación divulgada en la presente (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia de región variable (VL) que comprende la SEQ ID NO: 9, 18, 27, 36, 44 y 57).

En vista de la descripción anterior de las moléculas de unión a antígeno que pueden emplearse en los métodos divulgados, se analizarán ahora con más detalle métodos representativos.

#### ***Va. Método de administración de una dosis de un medicamento a un sujeto***

En un aspecto, se proporciona un método para administrar una dosis de un medicamento a un sujeto, la dosis que comprende una cantidad preseleccionada de células que presentan una molécula terapéutica que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1).

En realizaciones específicas, la dosis comprende  $0,5 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto,  $1,0 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto,  $2,0 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto,  $3,0 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto,  $4,0 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto, o  $5,0 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto, aunque el método puede emplearse usando cualquier dosis. La dosis preferida es de  $1,0 \times 10^6$  células por kilogramo del sujeto.

De acuerdo con la definición proporcionada en la presente, en varias realizaciones, un sujeto es un sujeto humano o no humano. Cuando el sujeto es un humano, el sujeto puede ser, por ejemplo, cualquier humano que esté siendo tratado por una condición fisiológica anormal, como cáncer o que haya sido diagnosticado formalmente con un trastorno, aquellos sin trastornos formalmente reconocidos, aquellos que reciben atención médica, aquellos en riesgo de desarrollar los trastornos, aquellos que están siendo estudiados por la presencia o ausencia de un trastorno, etc.

Inicialmente, se proporciona una muestra de volumen conocido que comprende una población que comprende un número conocido de células, células que se sabe o se sospecha que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1. En el método divulgado, el número de células puede determinarse usando cualquier método conocido. En las realizaciones preferidas, las células se cuentan usando un aparato automatizado, como un

clasificador de células (por ejemplo, un FACS), aunque también pueden emplearse métodos tradicionales de recuento de células no automatizados.

Las células del método pueden comprender cualquier tipo de célula, prefiriéndose especialmente las células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos). Se prefieren especialmente las células T (incluyendo las células T citotóxicas, T auxiliares y Treg). En realizaciones específicas, las células son células T, que pueden obtenerse como se describe en la presente y mediante métodos conocidos en la técnica. En el método puede emplearse cualquier tipo de célula, y la célula puede ser humana o no humana (incluyendo células procariotas y eucariotas). Las células ejemplares incluyen, entre otras, células inmunitarias como células T, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células NK-T. Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas. En realizaciones adicionales, las células son células T que presentan un CAR. Las células T pueden ser células T CD4+ o células T CD8+. Cuando en los métodos divulgados se emplea una célula T, la célula T puede ser una célula T in vivo o una célula T in vitro. Además, las células pueden disponerse en, o aislarse de, cualquier entorno capaz de mantener las células en una forma viable, como sangre, tejido o cualquier otra muestra obtenida de un sujeto, medios de cultivo celular, tejido cultivado *ex vivo*, etc. Para obtener células T también pueden emplearse la purificación en gradiente, la selección en cultivo celular y/o la clasificación celular.

La molécula terapéutica expresada por la célula puede comprender cualquier molécula que se sepa o se sospeche que proporciona un beneficio terapéutico a un sujeto al que se administra. Así, una molécula terapéutica puede ser un péptido o polipéptido de cualquier estructura o diseño. Preferiblemente, el componente SEQ ID NO: 1 se expresa o se dispone, por lo menos en parte, extracelularmente, es decir, en un grado en el que puede ser reconocido por un compañero de interacción extracelular como las moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación.

En realizaciones específicas, la molécula terapéutica es un CAR. Cuando la molécula terapéutica es un CAR puede comprender una molécula, o fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-Ia/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos.

Continuando, se proporciona una alícuota de la muestra que comprende una población de células que presentan una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1). La alícuota puede obtenerse usando cualquier medio conveniente, como un clasificador celular, simplemente pipeteando material de la muestra, etc.

Además, se proporciona una molécula de unión a antígeno que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) que comprende además un marcador detectable. La molécula de unión a antígeno es preferiblemente una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente, por ejemplo, en las figuras, el listado de secuencias o la presente divulgación. En el método, tal como se describe en la presente, puede emplearse cualquier marcador detectable y los marcadores adecuados pueden seleccionarse usando un conjunto de criterios deseado. Ejemplos de tipos de marcadores detectables incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, un colorante Atto, un colorante Alexafluor, puntos cuánticos, Hidroxicumarina, Aminocumarina, Metoxicumarina, azul Cascada, azul Pacífico, naranja Pacífico, amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, rojo Texas, alofococianina (APC), conjugados APC-Cy7, Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, DCFH, DHR, SNARF, GFP (mutación Y66H), GFP (mutación Y66F), EBFP, EBFP2, azurita, GFPuv, T-zafiro, cerúleo, mCFP, mTurquesa2, ECFP, CyPet, GFP (mutación Y66W), mKeima-Rojo, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, GFP (mutación S65A), Cian Midorishi, GFP de tipo salvaje, GFP (mutación S65C), TurboGFP, TagGFP, GFP (mutación S65L), Emerald, GFP (mutación S65T), EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellowl, naranja Kusabira, mOrange, Alofococianina (APC), mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, Monómero DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRedl, Katusha, P3, clorofila peridina (PerCP), mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y mRaspberry). Los colorantes ópticos adecuados, incluyendo los fluoróforos, se describen en Johnson, Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Techniques, 11ª edición, Life Technologies,

(2010), radiomarcadores (por ejemplo, marcadores isotópicos como  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), compuestos fotocrómicos, una etiqueta Halo, colorantes Atto, colorantes Tracy, marcadores fluorescentes proteínicos (por ejemplo, los marcadores fluorescentes proteínicos también incluyen, entre otros, la proteína verde fluorescente, incluyendo las especies Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie et al., (1994) Science 263:802-805), EGFP (Clon-tech Labs., Inc., Número de Registro del Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc; Stauber, (1998) Biotechniques 24:462-471; Heim et al., (1996) Curr. Biol. 6: 178-182), proteína fluorescente amarilla mejorada (Clontech Labs., Inc.), luciferasa (Ichiki et al., (1993) J. Immunol. 150:5408-5417), marcadores magnéticos (por ejemplo, DYNABEADS), etc. Las estrategias para el marcado de proteínas se conocen en la técnica y pueden emplearse en el método divulgado.

El marcador puede asociarse con la molécula de unión a antígeno en cualquier posición de la molécula, aunque es preferible asociar el marcador con la molécula en una posición (o posiciones, si se emplean múltiples marcadores) en un punto tal que las propiedades de unión de la molécula no se modifiquen (a menos que se desee dicha actividad de unión modificada). Puede emplearse cualquier molécula de unión a antígeno que se una específicamente a la SEQ ID NO: 1 (o fragmento de la misma). En la presente se proporcionan múltiples ejemplos de moléculas de unión a antígeno adecuadas, por ejemplo, las que tienen una o más de las CDR mostradas en las FIGURAS 5-21.

La molécula de unión a antígeno puede estar dispuesta en cualquier superficie, o en ninguna superficie. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno puede estar presente en un tampón y el tampón-molécula de unión a antígeno puede ponerse en contacto con la muestra. Alternativamente, la molécula de unión a antígeno puede asociarse a una superficie. Las superficies adecuadas incluyen perlas de agarosa, perlas magnéticas como DYNABEADS, o una placa de plástico, vidrio o cerámica como una placa de pocillos, una bolsa como una bolsa de cultivo celular, etc. La propia superficie puede estar dispuesta en otra estructura, como una columna.

A continuación, la alícuota de la muestra se pone en contacto con la molécula de unión a antígeno en condiciones que permiten la formación de un complejo de unión que comprende una célula presente en la muestra y la molécula de unión a antígeno. Por tanto, el resultado de este paso del método es la formación de un complejo de unión en el que la molécula de unión a antígeno, con la que se asocia un marcador detectable, se une a la célula que expresa la molécula terapéutica, que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1). De esta manera, es detectable el propio complejo de unión. Las condiciones que permiten la formación de un complejo de unión dependerán de una variedad de factores, sin embargo, generalmente los tampones acuosos a pH fisiológico y fuerza iónica, como en la solución salina tamponada con fosfato (PBS), favorecerán la formación de complejos de unión y se prefieren en el método divulgado.

A continuación se determina la fracción de células presentes en un complejo de unión en la alícuota. Este cálculo puede realizarse comparando el número de células que llevan el marcador detectable con las que no lo llevan, y puede representarse como porcentaje. Puede determinarse el número de células en complejos de unión. El método específico empleado para determinar la cantidad de células presentes en un complejo de unión dependerá de la naturaleza del marcador seleccionado. Por ejemplo, cuando se selecciona un marcador fluorescente puede emplearse FACS; cuando se selecciona un marcador isotópico, puede emplearse espectrometría de masas, NMR u otra técnica; cuando se elige un marcador magnético puede emplearse clasificación celular magnética; también puede emplearse microscopía. El número de células de la muestra se conoce *ab initio* y, por tanto, puede determinarse fácilmente la fracción de células presentes en un complejo de unión.

A continuación, se determina la concentración de células en la muestra inicial que expresan una molécula que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1); la determinación se basa en la fracción de células que se determina que están presentes en el complejo de unión y, por lo tanto, que expresan la proteína terapéutica que lleva un marcador detectable.

Se conoce la fracción de células que presentan la proteína terapéutica y se conoce el volumen de la alícuota; por lo tanto, una simple comparación del número de células de la muestra de la que se tomó la alícuota que expresan la molécula terapéutica con el volumen de la muestra más grande proporciona la fracción de células de la muestra que presentan la molécula terapéutica en una base molécula terapéutica/volumen (es decir, la concentración de células que portan la molécula terapéutica en la muestra más grande).

Luego se determina el volumen de la muestra que comprende la cantidad seleccionada de células, por extrapolación basada en la concentración de células que portan la molécula terapéutica presente en la muestra.

Finalmente, se administra al sujeto el volumen de muestra que comprende la cantidad deseada de células. La administración puede comprender un aspecto de un régimen terapéutico basado en la molécula terapéutica presente en la muestra y expresada por las células de la muestra.

Aunque la administración puede realizarse una vez o más de una vez, una ventaja del método es que al administrar una dosis que comprende la cantidad preseleccionada de células, la cantidad de células se determinará

basándose en una eficacia conocida o esperada, se evita la administración innecesaria de células que presentan la molécula terapéutica; es decir, el sujeto recibe el número correcto de células para proporcionar un beneficio terapéutico deseado y no se sobredosifica con células.

## 5 **Vb. Método para determinar la cantidad de células que presentan una molécula de interés**

Hay situaciones en las que puede ser deseable determinar la cantidad de células presentes en una muestra. Por ejemplo, puede ser deseable determinar la cantidad de células inmunitarias presentes en una muestra obtenida de un sujeto. O puede ser deseable determinar la cantidad de células transfectadas y que expresan un constructo, que puede usarse como medida del nivel de eficacia de la transfección. El método divulgado puede emplearse en estas y otras aplicaciones en las que sea deseable determinar la cantidad de células presentes en una muestra.

Así, se proporciona un método para determinar una cantidad de células que presentan una molécula en una muestra en donde la molécula comprende el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1).

En una realización, se proporciona una muestra que comprende células que se sabe o se sospecha que expresan una molécula que comprende la secuencia de aminoácidos del scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1).

La célula puede ser de cualquier tipo, y puede ser humana o no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc). En una realización preferida, la célula es una célula inmunitaria. Una célula inmunitaria del método puede ser cualquier tipo de célula inmunitaria (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos). Se prefieren especialmente las células T (incluyendo las células T citotóxicas, T auxiliares y Treg). En realizaciones específicas, las células son células T, que pueden obtenerse como se describe en la presente y mediante métodos conocidos en la técnica. En esta realización del método divulgado puede emplearse cualquier tipo de célula inmunitaria, y la célula puede ser humana o no humana (incluyendo células procariotas y eucariotas). Las células ejemplares incluyen, entre otras, células inmunitarias como células T, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células NK-T. Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas. En realizaciones adicionales, las células son células T que presentan un CAR. Las células T pueden ser células T CD4+ o células T CD8+. Cuando en los métodos divulgados se emplea una célula T, la célula T puede ser una célula T *in vivo* o una célula T *in vitro*. Además, las células pueden disponerse en, o aislarse de, cualquier entorno capaz de mantener las células en una forma viable, como sangre, tejido o cualquier otra muestra obtenida de un sujeto, medios de cultivo celular, tejido cultivado *ex vivo*, un tampón adecuado, etc.

En realizaciones específicas, la molécula que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) es un CAR. Cuando la molécula es un CAR puede comprender una molécula, o fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos.

A continuación, la muestra se pone en contacto con una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1 y comprende un marcador detectable, en condiciones que permiten la formación de un complejo de unión que comprende una célula presente en la muestra y la molécula de unión a antígeno. La molécula de unión a antígeno es preferiblemente una molécula de unión a antígeno (o fragmento de la misma) divulgada en la presente, por ejemplo, en las figuras, el listado de secuencias o la presente sección de la divulgación. En el método divulgado puede emplearse cualquier molécula de unión a antígeno que se una específicamente a la SEQ ID NO: 1. En la presente se proporcionan múltiples ejemplos de moléculas de unión a antígeno adecuadas, por ejemplo, las que tienen una o más de las CDR mostradas en la FIGURA 5-21.

En el método puede emplearse cualquier marcador detectable, como se describe en la presente, y los marcadores adecuados pueden seleccionarse usando un conjunto deseado de criterios. Ejemplos de tipos de marcadores detectables incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malaquita, estilbeno, amarillo Lucifer, azul Cascada, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Rojo 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Rojo 705, verde de Oregón, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa

Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), azul Cascade, amarillo Cascade y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes), FITC, Rodamina y Rojo Texas (Pierce), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science). Los colorantes ópticos adecuados, incluidos los fluoróforos, se describen en Johnson, Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Techniques, 11ª edición, Life Technologies, (2010), radiomarcadores (por ejemplo, marcadores isotópicos como  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), compuestos fotocromáticos, una etiqueta Halo, colorantes Atto, colorantes Tracy, marcadores fluorescentes proteínicos (por ejemplo, los marcadores fluorescentes proteínicos también incluyen, entre otros, la proteína verde fluorescente, incluyendo las especies Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie et al., (1994) Science 263:802-805), EGFP (Clon-tech Labs., Inc., Número de Registro Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc; Stauber, (1998) Biotechniques 24:462-471; Heim et al., (1996) Curr. Biol. 6: 178-182), proteína fluorescente amarilla mejorada (Clontech Labs., Inc.), luciferasa (Ichiki et al., (1993) J. Immunol. 150:5408-5417), marcadores magnéticos (por ejemplo, DYNABEADS), etc. Las estrategias para el marcado de proteínas son bien conocidas en la técnica y pueden emplearse en el método divulgado. Véase, por ejemplo, Obermaier et al., (2015) Methods Mol Biol 1295:153-65; Strack (2016) Nature Methods 13:33; Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols, (Gautier y Hinner, eds.) 2015, Springer.

El marcador puede asociarse con la molécula de unión a antígeno en cualquier posición de la molécula, aunque es preferible asociar el marcador con la molécula en una posición (o posiciones, si se emplean múltiples marcadores) en un punto tal que las propiedades de unión de la molécula no se modifiquen (a menos que se desee dicha actividad de unión modificada). Puede emplearse cualquier molécula de unión a antígeno que se una específicamente a la secuencia scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) (o fragmento de la misma), como las divulgadas en la presente, por ejemplo, las que tienen una o más de las CDR mostradas en las FIGURAS 5-21.

La molécula de unión a antígeno puede estar dispuesta en cualquier superficie, o en ninguna superficie. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno puede estar presente en un tampón y el tampón-molécula de unión a antígeno puede ponerse en contacto con la muestra. Alternativamente, la molécula de unión a antígeno puede asociarse a una superficie. Las superficies adecuadas incluyen perlas de agarosa, perlas magnéticas como DYNABEADS, o una placa de plástico, vidrio o cerámica como una placa de pocillos, una bolsa como una bolsa de cultivo celular, etc. La propia superficie puede estar dispuesta en otra estructura, como una columna.

Las condiciones que permiten la formación de un complejo de unión dependerán de una variedad de factores, sin embargo, generalmente los tampones acuosos a pH fisiológico y fuerza iónica, como en la solución salina tamponada con fosfato (PBS), favorecerán la formación de complejos de unión y se prefieren en el método divulgado.

A continuación, se determina la cantidad de células presentes en un complejo de unión en la muestra. El método específico empleado para determinar la cantidad de células presentes en un complejo de unión dependerá de la naturaleza del marcador seleccionado. Por ejemplo, cuando se selecciona un marcador fluorescente puede emplearse FACS; cuando se selecciona un marcador isotópico, puede emplearse espectrometría de masas, NMR u otra técnica; cuando se elige un marcador magnético puede emplearse clasificación celular magnética; también puede emplearse microscopía. El resultado de estos métodos de detección puede consistir en un número de células o puede ser de una forma que permita calcular el número de células basándose en el resultado.

### **Vc. Método de aislamiento de una molécula**

Es de gran valor tener la capacidad de separar diferentes poblaciones de moléculas, y particularmente moléculas biológicamente relevantes, unas de otras. Usando las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en la presente, tal separación puede lograrse y emplearse en una variedad de aplicaciones biotecnológicas, biofarmacéuticas y terapéuticas. Así, en un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para aislar una molécula que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra que se sabe o se sospecha que comprende una molécula que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1).

En realizaciones específicas, la molécula que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) es un CAR. Cuando la molécula es un CAR puede comprender una molécula, o fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGBI, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1,

CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos.

Se proporciona una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a la secuencia scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) y opcionalmente comprende un marcador detectable. Cuando se decide emplear un marcador detectable, en el método puede emplearse cualquier marcador detectable, como se describe en la presente, y los marcadores adecuados pueden seleccionarse usando un conjunto deseado de criterios. Los ejemplos de tipos de marcadores detectables incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malaquita, estilbeno, amarillo Lucifer, azul Cascade, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Rojo 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Rojo 705, verde de Oregón, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Azul Cascade, Amarillo Cascade y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes), FITC, Rodamina y Rojo Texas (Pierce), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science)). Los colorantes ópticos adecuados, incluyendo los fluoróforos, se describen en Johnson, *Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Techniques*, 11<sup>a</sup> edición, Life Technologies, (2010), radiomarcadores (por ejemplo, marcadores isotópicos como <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>F, <sup>35</sup>S, <sup>64</sup>CU, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), compuestos fotocromicos, una etiqueta Halo, colorantes Atto, colorantes Tracy, marcadores fluorescentes proteínicos (por ejemplo, los marcadores fluorescentes proteínicos también incluyen, entre otros, la proteína verde fluorescente, incluyendo las especies Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie et al., (1994) *Science* 263:802-805), EGFP (Clon-tech Labs., Inc., Número de Registro de Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc; Stauber, (1998) *Biotechniques* 24:462-471; Heim et al., (1996) *Curr. Biol.* 6: 178-182), proteína fluorescente amarilla mejorada (Clontech Labs., Inc.), luciferasa (Ichiki et al., (1993) *J. Immunol.* 150:5408-5417), marcadores magnéticos (por ejemplo, DYNABEADS), etc. Las estrategias para el marcado de proteínas son bien conocidas en la técnica y pueden emplearse en el método divulgado. Véase, por ejemplo, Obermaier et al., (2015) *Methods Mol Biol* 1295:153-65; Strack (2016) *Nature Methods* 13:33; Site-Specific Protein Labeling: *Methods and Protocols*, (Gautier y Hinner, eds.) 2015, Springer.

El marcador puede asociarse con la molécula de unión a antígeno en cualquier posición de la molécula, aunque es preferible asociar el marcador con la molécula en una posición (o posiciones, si se emplean múltiples marcadores) en un punto tal que las propiedades de unión de la molécula no se modifiquen (a menos que se desee dicha actividad de unión modificada). Puede emplearse cualquier molécula de unión a antígeno que se una específicamente a la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) (o fragmento de la misma), como las divulgadas en la presente, por ejemplo, las que tienen una o más de las CDR mostradas en las FIGURAS 5-21.

La molécula de unión a antígeno puede disponerse en cualquier superficie, o en ninguna superficie. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno puede estar presente en un tampón y el tampón-molécula de unión a antígeno puede ponerse en contacto con la muestra. Alternativamente, la molécula de unión a antígeno puede asociarse con una superficie. Las superficies adecuadas incluyen perlas de agarosa, perlas magnéticas como DYNABEADS, o una placa de plástico, vidrio o cerámica como una placa de pocillos, una bolsa como una bolsa de cultivo celular, etc. La propia superficie puede estar dispuesta en otra estructura, como una columna.

Las condiciones que permiten la formación de un complejo de unión dependerán de una variedad de factores, sin embargo, generalmente los tampones acuosos a pH fisiológico y fuerza iónica, como en la solución salina tamponada con fosfato (PBS), favorecerán la formación de complejos de unión y se prefieren en el método divulgado. Como las partes componentes de un complejo de unión pueden disponerse sobre superficies como se describe en la presente, los complejos de unión formados también pueden disponerse sobre superficies.

En esta etapa, pueden no haberse formado complejos de unión, o pueden haberse formado una pluralidad de complejos de unión que comprenden una o más moléculas de unión a antígeno unidas a una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 (o una o más moléculas que comprenden SEQ ID NO: 1 unidas a una molécula de unión a antígeno). Las moléculas no unidas que comprenden la SEQ ID NO: 1 y/o moléculas de unión a antígeno no unidas también pueden estar presentes en el entorno local de cualquier complejo de unión formado.

Cualquier molécula que no forme parte de un complejo de unión se separa luego de cualquier complejo de unión formado. El método de separación dependerá de la estructura y/o del entorno local de los complejos de unión. Por ejemplo, si la molécula de unión a antígeno está dispuesta en una perla, placa o bolsa, los componentes no unidos de la mezcla de reacción pueden lavarse usando una solución que deje intactos los complejos de unión formados. Si un complejo de unión está dispuesto en una perla, la propia perla puede estar situada en una columna u otra estructura y puede usarse el mismo enfoque.

La solución usada para inducir la formación de complejos de unión puede usarse, por ejemplo, como solución de lavado para eliminar los componentes no unidos. También puede usarse cualquier tampón o solución adecuada que no altere los complejos de unión formados. Típicamente, al realizar este paso del método se evitan preferiblemente los tampones que tienen altas concentraciones de sal, pH no fisiológico, que contienen caótropos o desnaturalizantes.

Un complejo de unión formado se separa luego en (a) una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, y (b) una molécula de unión a antígeno. La separación puede lograrse usando metodologías estándar conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede lavarse sobre los complejos una solución de pH y composición adecuados. Una solución que se emplea comúnmente para este propósito es HCl de glicina 0,1 M, pH 2,5-3,0, y esta solución puede emplearse para lograr la separación. Otras soluciones que pueden emplearse incluyen ácido cítrico 100 mM, pH 3,0, trietilamina o trietanolamina 50-100 mM, pH 11,5; hidróxido de amonio 150 mM, pH 10,5; glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0; cloruro de litio 5 M, cloruro de magnesio o potasio 3,5 M, cloruro de potasio 3,0 M, yoduro de sodio o potasio 2,5 M, tiocianato sódico 0,2-3,0 M, Tris-acetato 0,1 M con NaCl 2,0 M, pH 7,7; HCl de guanidina 2-6 M, urea 2-8 M, tiocianato amónico 1,0 M, 1% de desoxicolato sódico 1% de SDS; y 10% de dioxano 50% de etilenglicol, pH 8-11,5.

Después de la separación, si la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es de interés primario puede recogerse; alternatively, si la molécula de unión a antígeno es de interés primario puede recogerse.

#### **Vd. Método para determinar la presencia o ausencia de una molécula**

Como se divulga en la presente, a veces puede ser deseable aislar una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), como se proporciona en la presente. En otros casos, es información suficiente simplemente saber si una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 proporcionada en la presente está presente o ausente de una muestra. Por ejemplo, puede ser beneficioso saber que dicha molécula se está expresando, independientemente del nivel de expresión. En otros casos, puede ser deseable saber si se ha llevado a cabo eficazmente un proceso o paso de purificación diseñado para eliminar dicha molécula. Así, en múltiples aplicaciones puede ser útil la determinación cualitativa de la presencia o ausencia de una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) de la presente divulgación. En vista de esto, se proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 en una muestra.

En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra que se sabe o se sospecha que comprende una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es un CAR. Cuando la molécula es un CAR puede comprender una molécula, o fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CD11a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos.

Se proporciona una molécula de unión a antígeno que comprende un marcador detectable que se une específicamente al scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1). Los marcadores adecuados pueden seleccionarse usando un conjunto de criterios deseado. Los ejemplos de tipos de marcadores detectables incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malaquita, estilbino, amarillo Lucifer, azul Cascade, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Rojo 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Rojo 705, verde de Oregón, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Azul Cascade, Amarillo Cascade y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes), FITC, Rodamina y Rojo Texas (Pierce), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science)). Los colorantes ópticos adecuados, incluyendo los fluoróforos, se describen en Johnson, Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Techniques, 11ª edición, Life Technologies, (2010), radiomarcadores (por ejemplo, marcadores isotópicos como <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>F, <sup>35</sup>S, <sup>64</sup>CU, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), compuestos fotocromáticos, una etiqueta Halo, colorantes Atto, colorantes Tracy, marcadores fluorescentes proteínicos (por ejemplo, los marcadores fluorescentes proteínicos también incluyen, entre otros, la proteína verde fluorescente, incluyendo una especie de Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie et al., (1994) Science 263:802-805), EGFP (Clon-tech Labs., Inc., Número de Registro de Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc; Stauber, (1998) Biotechniques 24:462-471; Heim et al., (1996) Curr. Biol. 6: 178-182), proteína fluorescente amarilla mejorada (Clontech Labs., Inc.), luciferasa (Ichiki et al., (1993) J. Immunol. 150:5408-5417), marcadores magnéticos (por ejemplo, DYNABEADS), etc. Las estrategias para el marcado de proteínas son bien conocidas en la técnica y pueden emplearse en el método divulgado. Véase, por ejemplo, Obermaier et al., (2015) Methods Mol Biol 1295:153-65; Strack (2016) Nature Methods



13:33; Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols, (Gautier y Hinner, eds.) 2015, Springer.

El marcador puede asociarse con la molécula de unión a antígeno en cualquier posición de la molécula, aunque es preferible asociar el marcador con la molécula en una posición (o posiciones, si se emplean múltiples marcadores) en un punto tal que las propiedades de unión de la molécula no se modifiquen (a menos que se desee dicha actividad de unión modificada). Puede emplearse cualquier molécula de unión a antígeno que se una específicamente a la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1 o fragmento de la misma), como las divulgadas en la presente, por ejemplo, las que tienen una o más de las CDR mostradas en las FIGURAS 5-21.

A continuación, la muestra se pone en contacto con la molécula de unión a antígeno bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de unión que comprende una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 (que puede ser presentada en una célula) presente en la muestra y la molécula de unión a antígeno. La molécula de unión a antígeno puede estar dispuesta en cualquier superficie, o en ninguna. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno puede estar presente en un tampón y el tampón-molécula de unión a antígeno puede ponerse en contacto con la muestra. Alternativamente, la molécula de unión a antígeno puede asociarse a una superficie. Las superficies adecuadas incluyen perlas de agarosa, perlas magnéticas como DYNABEADS, o una placa de plástico, vidrio o cerámica como una placa de pocillos, una bolsa como una bolsa de cultivo celular, etc. La propia superficie puede disponerse en otra estructura, como una columna.

Las condiciones que permiten la formación de un complejo de unión dependerán de una variedad de factores, sin embargo, generalmente los tampones acuosos a pH fisiológico y fuerza iónica, como en la solución salina tamponada con fosfato (PBS), favorecerán la formación de complejos de unión y se prefieren en el método divulgado. Como los componentes de un complejo de unión pueden disponerse sobre superficies como se describe en la presente, los complejos de unión formados también pueden disponerse sobre superficies.

En esta etapa, pueden no haberse formado complejos de unión, o pueden haberse formado una pluralidad de complejos de unión que comprenden una o más moléculas de unión a antígeno unidas a una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) (o una o más moléculas que comprenden la SEQ ID NO: 1 unida a una molécula de unión a antígeno). En el entorno local de cualquier complejo de unión formado también puede haber moléculas no unidas que comprenden la SEQ ID NO: 1 y/o moléculas de unión a antígeno no unidas.

Cualquier molécula que no forme parte de un complejo de unión se separa entonces de cualquier complejo de unión formado. El método de separación dependerá de la estructura y/o del entorno local de los complejos de unión. Por ejemplo, si la molécula de unión a antígeno está dispuesta en una perla, placa o bolsa, los componentes no unidos de la mezcla de reacción pueden lavarse usando una solución que deje intactos los complejos de unión formados. Si en una perla está dispuesto un complejo de unión, la propia perla puede estar situada en una columna u otra estructura y puede usarse el mismo enfoque.

La solución usada para inducir la formación de complejos de unión puede usarse, por ejemplo, como solución de lavado para eliminar los componentes no unidos. También puede usarse cualquier tampón o solución adecuada que no altere los complejos de unión formados. Típicamente, al realizar este paso del método deben evitarse los tampones que tienen altas concentraciones de sal, pH no fisiológico, que contienen caótropos o desnaturalizantes.

Por último, se detecta la presencia o ausencia de un complejo de unión, que comprenderá una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 y una molécula de unión a antígeno. El método específico empleado para detectar la presencia o ausencia de un complejo de unión dependerá de la naturaleza del marcador seleccionado. Por ejemplo, cuando se selecciona un marcador fluorescente puede emplearse citometría de flujo o FACS; cuando se selecciona un marcador isotópico puede emplearse espectrometría de masas, NMR u otra técnica; cuando se elige un marcador magnético puede emplearse clasificación celular magnética; también puede emplearse microscopía. El resultado final del método es una evaluación cualitativa de la presencia o ausencia de la molécula de unión a antígeno que comprende el marcador detectable, y por lo tanto, la presencia o ausencia de su compañero de unión, la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1.

Como es el caso con todos los métodos divulgados, la molécula que comprende la secuencia del scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) puede disponerse en cualquier entorno. En realizaciones preferidas, la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 se expresa en la superficie de una célula. En esta realización, la célula puede ser de cualquier tipo, y puede ser humana o no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.). En una realización preferida, la célula es una célula inmunitaria. Una célula inmunitaria del método puede ser cualquier tipo de célula inmunitaria (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos). Se prefieren especialmente las células T (incluyendo las células T citotóxicas, T auxiliares y Treg). En realizaciones específicas, las células son células T, que pueden obtenerse como se describe en la presente y mediante métodos conocidos en la técnica. En esta realización del método descrito puede emplearse cualquier tipo de célula inmunitaria, y la célula puede ser humana o no humana (incluyendo células procariotas y eucariotas). Las células ejemplares incluyen, entre otras, células inmunitarias como

células T, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células NK-T. Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas. En otras realizaciones, las células son células T que presentan un CAR. Las células T pueden ser células T CD4+ o células T CD8+. Cuando en los métodos divulgados se emplea una célula T, la célula T puede ser una célula T *in vivo* o una célula T *in vitro*.

En una realización adicional, la célula puede disponerse en, o aislarse de, cualquier entorno capaz de mantener la célula en forma viable, como sangre, tejido o cualquier otra muestra obtenida de un sujeto, medios de cultivo celular, tejido cultivado *ex vivo*, un tampón adecuado, etc.

#### **Ve. Método para aumentar la concentración de una molécula**

Muy a menudo, una molécula de interés está presente en una muestra en niveles inferiores a los deseados. Por ejemplo, cuando una célula se transfecta con un gen extraño, los niveles de expresión de la proteína o proteínas codificadas por el gen extraño son a veces bajos. Lo mismo puede ocurrir con las moléculas secretadas por una célula; tales moléculas están presentes a menudo en cantidades bajas (pero todavía pueden detectarse usando los métodos proporcionados en la presente, si la molécula comprende la secuencia del scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1). Una solución al problema de los bajos niveles de expresión es aumentar la concentración de la molécula de interés, que puede estar libre en solución, o expresarse en la superficie de una célula. También puede aumentarse la concentración de moléculas de interés expresadas intracelularmente, pero primero hay que lisar las células para liberar la molécula. Para abordar este problema, se proporciona un método para aumentar la concentración de células que presentan una molécula que comprende la secuencia del scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra que comprende células que se sabe o se sospecha que presentan una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1).

En realizaciones específicas, la molécula que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 es un CAR. Cuando la molécula es un CAR puede comprender una molécula, o fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GTR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos.

Se proporciona una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a SEQ ID NO: 1, y opcionalmente comprende un marcador detectable. Cuando se decide emplear un marcador detectable, en el método puede emplearse cualquier marcador detectable, como se describe en la presente, y los marcadores adecuados pueden seleccionarse usando un conjunto de criterios deseado. Ejemplos de tipos de marcadores detectables incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malaquita, estilbena, amarillo Lucifer, azul Cascade, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Rojo 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Rojo 705, verde de Oregón, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Azul Cascade, Amarillo Cascade y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes), FITC, Rodamina y Rojo Texas (Pierce), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science)). Los colorantes ópticos adecuados, incluyendo los fluoróforos, se describen en Johnson, Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Techniques, 11ª edición, Life Technologies, (2010), radiomarcadores (por ejemplo, marcadores isotópicos como <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>F, <sup>35</sup>S, <sup>64</sup>CU, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), compuestos fotocromáticos, una etiqueta Halo, colorantes Atto, colorantes Tracy, marcadores fluorescentes proteínicos (por ejemplo, los marcadores fluorescentes proteínicos también incluyen, entre otros, la proteína verde fluorescente, incluyendo una especie de Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie et al., (1994) Science 263:802-805), EGFP (Clon-tech Labs., Inc., Número de Registro de Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc; Stauber, (1998) Biotechniques 24:462-471; Heim et al., (1996) Curr. Biol. 6: 178-182), proteína fluorescente amarilla mejorada (Clontech Labs., Inc.), luciferasa (Ichiki et al., (1993) J. Immunol. 150:5408-5417), marcadores magnéticos (por ejemplo, DYNABEADS), etc. Las estrategias para el marcado de proteínas son bien conocidas en la técnica y pueden emplearse en el método divulgado. Véase, por ejemplo, Obermaier et al., (2015) Methods Mol Biol 1295:153-65; Strack (2016) Nature Methods 13:33; Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols, (Gautier y Hinner, eds.) 2015, Springer.

El marcador puede asociarse con la molécula de unión a antígeno en cualquier posición de la molécula, aunque es preferible asociar el marcador con la molécula en una posición (o posiciones, si se emplean múltiples marcadores) en un punto tal que las propiedades de unión de la molécula no se modifiquen (a menos que se desee dicha actividad de unión modificada). Puede emplearse cualquier molécula de unión a antígeno que se una específicamente a la secuencia scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) (o fragmento de la misma), como las que se divulgan en la presente, por ejemplo, las que tienen una o más de las CDR que se muestran en las FIGURAS 5 a 21.

La molécula de unión a antígeno puede estar dispuesta en cualquier superficie, o en ninguna superficie. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno puede estar presente en un tampón y el tampón-molécula de unión a antígeno puede ponerse en contacto con la muestra. Alternativamente, la molécula de unión a antígeno puede asociarse a una superficie. Las superficies adecuadas incluyen perlas de agarosa, perlas magnéticas como DYNABEADS, o una placa de plástico, vidrio o cerámica como una placa de pocillos, una bolsa como una bolsa de cultivo celular, etc. La propia superficie puede estar dispuesta en otra estructura, como una columna.

Una célula que presenta una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 puede ser de cualquier tipo, y puede ser humana o no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.). En una realización preferida, la célula es una célula inmunitaria. Una célula inmunitaria del método puede ser cualquier tipo de célula inmunitaria (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos). Se prefieren especialmente las células T (incluyendo las células T citotóxicas, T auxiliares y Treg). En realizaciones específicas, las células son células T, que pueden obtenerse como se describe en la presente y mediante métodos conocidos en la técnica. En esta realización del método descrito puede emplearse cualquier tipo de célula inmunitaria, y la célula puede ser humana o no humana (incluyendo células procariontes y eucariotas). Las células ejemplares incluyen, entre otras, células inmunitarias como células T, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células NK-T. Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas. En otras realizaciones, las células son células T que presentan un CAR. Las células T pueden ser células T CD4+ o células T CD8+. Cuando en los métodos divulgados se emplea una célula T, la célula T puede ser una célula T *in vivo* o una célula T *in vitro*. Además, las células pueden disponerse en, o aislarse de, cualquier entorno capaz de mantener las células en forma viable, como sangre, tejido o cualquier otra muestra obtenida de un sujeto, medios de cultivo celular, tejido cultivado *ex vivo*, un tampón adecuado, etc.

La muestra que comprende células se pone en contacto con la molécula de unión a antígeno, en condiciones que permiten la formación de un complejo de unión que comprende una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) y la molécula de unión a antígeno. Las condiciones que permiten la formación de un complejo de unión dependerán de una variedad de factores, sin embargo, generalmente los tampones acuosos a pH fisiológico y fuerza iónica, como en solución salina tamponada con fosfato (PBS), favorecerán la formación de complejos de unión y se prefieren en el método divulgado. Como los componentes de un complejo de unión pueden disponerse sobre superficies como se describe en la presente, los complejos de unión formados también pueden disponerse sobre superficies.

En esta etapa, pueden no haberse formado complejos de unión, o pueden haberse formado una pluralidad de complejos de unión que comprenden una o más moléculas de unión a antígeno unidas a una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) (o una o más moléculas que comprenden SEQ ID NO: 1 unida a una molécula de unión a antígeno). En el entorno local de cualquier complejo de unión formado también puede haber moléculas no unidas que comprenden la SEQ ID NO: 1 y/o moléculas de unión a antígeno no unidas.

Cualquier molécula o célula que no forme parte de un complejo de unión se separa luego de cualquier complejo de unión formado. El método de separación dependerá de la estructura y/o el entorno local de los complejos de unión. Por ejemplo, si la molécula de unión a antígeno está dispuesta en una perla, placa o bolsa, los componentes no unidos de la mezcla de reacción pueden lavarse usando una solución que deje intactos los complejos de unión formados. Si un complejo de unión está dispuesto en una perla, la propia perla puede estar situada en una columna u otra estructura y puede usarse el mismo enfoque.

La solución usada para inducir la formación de complejos de unión puede usarse, por ejemplo, como solución de lavado para eliminar los componentes no unidos. También puede usarse cualquier tampón o solución adecuada que no altere los complejos de unión formados. Típicamente, al realizar este paso del método deben evitarse los tampones que tienen altas concentraciones de sal, pH no fisiológico, que contienen caótropos o desnaturalizantes,.

En esta etapa del método, habrá una población de células que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1. Si se empleó un marcador detectable, la concentración de las células puede determinarse fácilmente, de acuerdo con la naturaleza del marcador. No habrá células que no expresen la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, y por lo tanto la población (o concentración) de células que presentan una molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 aumentará en comparación con los niveles previos a la realización del método.

Si la concentración de la molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) no está a un nivel deseado, los pasos anteriores pueden repetirse un número deseado de veces. En el contexto de este paso del método, un número deseado de veces también puede ser cero, si ya hay la concentración deseada de células.

#### **Vf. Método para agotar una población de células inmunitarias**

Cuando un sujeto tiene una afección mediada por células inmunitarias, puede ser de importancia significativa que la afección sea controlada de manera oportuna para prevenir daño al sujeto. Por ejemplo, cuando un sujeto tiene una reacción autoinmune puede ser deseable suprimir una respuesta mediada por células inmunitarias mediante el agotamiento de una población de células inmunitarias, en un esfuerzo por prevenir daños. En otro ejemplo, un sujeto que recibe inmunoterapia puede reaccionar demasiado a la terapia y correr el riesgo de sufrir daños; agotar la población de células inmunitarias administradas al sujeto puede ser un enfoque eficaz para mitigar la reacción del sujeto a la inmunoterapia. En vista de la necesidad de un método para controlar la respuesta mediada por células inmunitarias de un sujeto, se proporciona un método para agotar una población de células inmunitarias que presentan una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1). En el método puede emplearse una molécula de unión a antígeno que reconozca específicamente la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, las que tienen una o más de las CDR mostradas en la Figura 6.

En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una población de células inmunitarias que se van a agotar, en donde se sabe o se sospecha que las células expresan una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1).

En realizaciones específicas, la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 es un CAR. Cuando la molécula es un CAR puede comprender una molécula, o fragmento de la misma, seleccionada del grupo que consiste en CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador inducible de células T (ICOS), antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, y combinaciones de los mismos.

Una célula inmunitaria que expresa una molécula que comprende la secuencia de scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) puede ser de cualquier tipo, y puede ser humana o no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.). Una célula inmunitaria del método puede ser cualquier tipo de célula inmunitaria (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos). Se prefieren especialmente las células T (incluyendo las células T citotóxicas, T auxiliares y Treg). En realizaciones específicas, las células son células T, que pueden obtenerse como se describe en la presente y mediante métodos conocidos en la técnica. En esta realización del método descrito puede emplearse cualquier tipo de célula inmunitaria, y la célula puede ser humana o no humana (incluyendo células procariontes y eucariotas). Las células ejemplares incluyen, entre otras, células inmunitarias como células T, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas y células NK-T. Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas. En otras realizaciones, las células son células T que presentan un CAR. Las células T pueden ser células T CD4+ o células T CD8+. Cuando en los métodos divulgados se emplea una célula T, la célula T puede ser una célula T *in vivo* o una célula T *in vitro*. Además, las células pueden disponerse en, o aislarse de, cualquier entorno capaz de mantener las células en una forma viable, como sangre, tejido o cualquier otra muestra obtenida de un sujeto, medios de cultivo celular, tejido cultivado *ex vivo*, un tampón adecuado, etc. Como el método divulgado puede emplearse en entornos terapéuticos, en realizaciones preferidas la población de células inmunitarias se dispone en un sujeto, y más preferiblemente en un sujeto humano.

A continuación, las células inmunitarias se ponen en contacto con una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a (a) la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, y (b) una molécula activadora expresada en la superficie de la célula inmunitaria que no expresa la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, en condiciones que permiten la formación de un complejo de unión ternario que comprende la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, la molécula activadora y la molécula de unión a antígeno. La molécula de unión a antígeno puede disponerse en cualquier superficie, o en ninguna. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno (que también puede comprender la población de células inmunitarias a agotar y/o puede estar presente en un tampón) y el tampón-molécula de unión a antígeno pueden ponerse en contacto con la muestra. Alternativamente, la molécula de unión a antígeno puede

asociarse con una superficie. Las superficies adecuadas incluyen perlas de agarosa, perlas magnéticas como DYNABEADS, o una placa de plástico, vidrio o cerámica como una placa de pocillos, una bolsa como una bolsa de cultivo celular, etc. La propia superficie puede estar dispuesta en otra estructura, como una columna.

Las células inmunitarias se ponen en contacto con la molécula de unión a antígeno, en condiciones que permiten la formación de un complejo de unión ternario que comprende una molécula que comprende la secuencia del scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), la molécula de unión a antígeno y una molécula activadora expresada en la superficie de una célula inmunitaria que no expresa la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1. Las condiciones que permiten la formación del complejo de unión dependerán de una variedad de factores, sin embargo, generalmente los tampones acuosos a pH fisiológico y fuerza iónica, como en la solución salina tamponada con fosfato (PBS), favorecerán la formación de complejos de unión y se prefieren en el método divulgado. Como los componentes de un complejo de unión pueden disponerse sobre superficies como se describe en la presente, los complejos de unión formados también pueden disponerse sobre superficies.

En realizaciones preferidas, el contacto se realiza administrando la molécula de unión a antígeno directamente a un sujeto. En esta realización, el sujeto ya tendrá una población de células a agotar, en donde las células expresan una molécula que comprende la secuencia del scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1). Por lo tanto, estas células, así como las células que presentan una molécula activadora, estarán presentes en el sujeto antes de la administración de la molécula de unión a antígeno al sujeto. El entorno sanguíneo, linfático y tisular humano permitirá la formación de complejos de unión ternarios. La unión de la molécula de unión a antígeno con la molécula que comprende la secuencia del scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) sirve para "etiquetar" las células que presentan la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1 (es decir, las células que se van a agotar). Este evento de unión puede o no lleva al agotamiento por sí mismo. Sin embargo, cuando la molécula de unión a antígeno se une a la molécula activadora para formar el complejo de unión ternario, este evento de unión hace que ambas células (es decir, la célula que expresa la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1, y la célula que expresa la molécula activadora) se junten en proximidad. El resultado fisiológico del evento de unión es la muerte de la célula que expresa la molécula que comprende la SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, al producirse múltiples eventos de unión en todo el sujeto, la población de células inmunitarias portadoras de la molécula que contiene SEQ ID NO: 1 se agota y disminuye el riesgo de daño para el sujeto.

## SECUENCIAS Y SEQ ID NO

La presente divulgación comprende una serie de secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos. Por conveniencia, la tabla siguiente correlaciona cada secuencia con su descripción apropiada y SEQ ID NO.

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	scFv FMC63 Anti-CD19	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGS TKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNKSKSQ VFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS
2	Clon 7 VH	ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGT GCTCAAAGGTGTCCAGTGTCCAGGAGCAGCTGGAGGAGT CCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGAGGAACCCTGAC AGTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAACA ATGGAATTTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG CTGGAGTGGATCGGATGTCTTTATGTTGGTAGTAGTGA TACCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCA CCATCTCCAAAAGCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAA ATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATTT CTGTACGATAAATCTCGGCTTGTGGGGCCCCGGCACCC TGGTCACCGTCTCCTCA

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
3	Clon 7 VH	METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLLEESGGDLVKPGGTLT VTCKASGFSESNNGICWVRQAPGKGLEWIGCLYVGSSDT TYYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCTI <u>NLGLWGPGLVTVSS</u>
4	Clon 7 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLLEESGGDLVKPGGTLT VTCKASGFSESNNGICWVRQAPGKGLEWIGCLYVGSSDT TYYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCTI <u>NLGLWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTL</u> <u>GCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSL</u> SSVSVTSSSQPVTNCVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTC PPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQDD PEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQ DWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYT MGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWENKGAEDN YKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH EALHNHYTQKSISRSPGK
5	Clon 7 VH CDR1	GFSESN
6	Clon 7 VH CDR2	YVGSSD
7	Clon 7 VH CDR3	NLGL
8	Clon 7 VL	ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCACATTTGCCATCGTGGT GACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAG GCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAGTGTT TATAATAGCGACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATGCTGCATCCA  CTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGCTTCAAAGGCAGT GGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGATGT GGTGTGTGACGATGCTGCCACTTATTATTGTGCAGGAT ATAAAAGTAGTAGTACTGATGGGATTGCTTTCGGCGGA GGGACCGAGGTGCTGGTCAA
9	Clon 7 VL	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAIVVTQTPSSKSVVGGT VTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASTLA <u>SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYYCAGYKSSS</u> <u>TDGIAFGGGTEVVVK</u>

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
10	Clon 7 LC	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAIVVTQTPSSKSVPVGGT VTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASLA SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVVCDAAATYYCAGYKSSS TDGIAFGGGTEVVVKGDPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTI VCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCT YNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
11	Clon 7 VL CDR1	QASESVYNSDWLA
12	Clon 7 VL CDR2	AASLAS
13	Clon 7 VL CDR3	AGYKSSSTDGIA
14	Clon 13 VH	ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGT GCTCAAAGGTGTCCAGTGTCAAGCCTGGAGGAACCCCTGAC CCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGAGGAACCCCTGAC AGTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAACA ATGGAATTTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG CTGGAGTGGATCGGATGTCTTTATGTTGGTAGTAGTGA TACCACCTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCA CCATCTCCAAAAGCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAA ATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATTT CTGTACGATAAATCTCGGCTTGTGGGGCCCCGGCACCC TGGTCACCGTCTCCTCA
15	Clon 13 VH	METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLSESGGDLVKPGGTLT VTCKASGFSFSNNGICWVRQAPGKGLEWIGCLYVGSSDT TYYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCTI NLGLWGPGLTVTVSS
16	Clon 13 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLSESGGDLVKPGGTLT VTCKASGFSFSNNGICWVRQAPGKGLEWIGCLYVGSSDT TYYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCTI NLGLWGPGLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTL GCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVTRTFPSVRQSSGLYSL SSVVSSTSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTC PPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDD PEVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQ DWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYT MGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDN YKTTPAVLDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH EALHNHYTOKSISRSPGK
5	Clon 13 VH CDR1	GFSFSNN
6	Clon 13 VH CDR2	YVGSSD
7	Clon 13 VH CDR3	NLGL
17	Clon 13 VL	ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCACACTTGCCAICGTGGT

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
5		GACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAG GCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAGTGTT 10 TATAATAGCGACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATGCTGCATCCA CTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGCTTCAAAGGCAGT GGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCACCATCAGCGATGT 15 GGTGTGTGACGATGCTGCCACTTATTATTGTGCAGGAT ATAAAAGTAGTAGTACTGATGGGATTGCTTTCGGCGGA GGGACCGAGGTGGTGGTCAA
20		GACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAG GCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAGTGTT TATAATAGCGACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATGCTGCATCCA 25 CTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGCTTCAAAGGCAGT GGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCACCATCAGCGATGT GGTGTGTGACGATGCTGCCACTTATTATTGTGCAGGAT ATAAAAGTAGTAGTACTGATGGGATTGCTTTCGGCGGA GGGACCGAGGTGGTGGTCAA
30	18 Clon 13 VL	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGT VTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASLA <u>SGVPSRFRKGS</u> SGTQFTLTISDVVCDDAATYYC <u>AGYKSSS</u> <u>TDGIA</u> FGGGTEVVVK MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGT VTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASLA 35 <u>SGVPSRFRKGS</u> SGTQFTLTISDVVCDDAATYYC <u>AGYKSSS</u> <u>TDGIA</u> FGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTI VCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCT YNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
40		MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGT VTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASLA <u>SGVPSRFRKGS</u> SGTQFTLTISDVVCDDAATYYC <u>AGYKSSS</u> <u>TDGIA</u> FGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTI VCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCT YNLSSTLTLTSTOYNHKEYTCKVTOGTTSVVOSFNRGDC
45	19 Clon 13 LC	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGT VTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQLIYAASLA <u>SGVPSRFRKGS</u> SGTQFTLTISDVVCDDAATYYC <u>AGYKSSS</u> <u>TDGIA</u> FGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTI VCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCT YNLSSTLTLTSTOYNHKEYTCKVTOGTTSVVOSFNRGDC
50	11 Clon 13 VL CDR1	QASESVYNSDWLA
	12 Clon 13 VL CDR2	AASLAS
	13 Clon 13 VL CDR3	AGYKSSTDGIA



(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
20	Clon 14-1 VH	<p>ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGT  GCTCAAAGGTGTCCAGTGTCAAGGAGCAGCTGGAGGAGT  CCGGGGGAGGCCCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACA  CTACCTGCAAAGCCTCTGGATTTCGACTTCAGTATCAA  CTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG  GGTTGGAGTGGATCGCATGCATTTATACTGGTGATGAT  GACACTTCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGGTTCAC  CATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAAC  TGAACAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTTC  TGTGTGAGAGGTCTATATAGTGGTAGTATTAATAACCT  GTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA</p>
21	Clon 14-1VH	<p>ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGT  GCTCAAAGGTGTCCAGTGTCAAGGAGCAGCTGGAGGAGT  CCGGGGGAGGCCCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACA  CTACCTGCAAAGCCTCTGGATTTCGACTTCAGTATCAA  CTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG  GGTTGGAGTGGATCGCATGCATTTATACTGGTGATGAT  GACACTTCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGGTTCAC  CATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAAC  TGAACAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTTC  TGTGTGAGAGGTCTATATAGTGGTAGTATTAATAACCT  GTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA  METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLLEESGGGLVKPGASLTL  TCKASGFDFSINYYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDDDDT  FYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRG  LYSGSINNLLWPGTLVTVSS  METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLLEESGGGLVKPGASLTL  TCKASGFDFSINYYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDDDDT  FYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRG  LYSGSINNLLWPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSS  TVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSG  LYSLSSVSVTSSSQPVTNCVAHPATNTKVDKTVAPSTCS  KPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  QDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPI  AHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPK  VYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKA  EDNYKTPAVLSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCS  VMHEALHNHYTQKSISRSPGK</p>
22	Clon 14-1HC	<p>METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLLEESGGGLVKPGASLTL  TCKASGFDFSINYYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDDDDT  FYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRG  LYSGSINNLLWPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSS  TVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSG  LYSLSSVSVTSSSQPVTNCVAHPATNTKVDKTVAPSTCS  KPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  QDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPI  AHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPK  VYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKA  EDNYKTPAVLSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCS  VMHEALHNHYTQKSISRSPGK</p>

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
23	Clon 14-1VH CDR1	GFDFSINY
24	Clon 14-1VH CDR2	YTGDD
25	Clon 14-1VH CDR3	GLYSGSINN
26	Clon 14-1VL	ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATGCCAGATGTGCGCTTGTGATGACCCAGACTCCATCCCCCTGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAGTTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTATAACAACGACTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAACCTCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCGCTTACTATTGTGCAGGCGTTAAAGGTTATAGTAATGATAATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA
27	Clon 14-1VL	MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQASQSVYNNDYLSWYQQKPGQPPKLLIYYASTLASGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCDDAAAYYCAGVKGYSDNNNGFGGGTEVVVK
28	Clon 14-1LC	MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQASQSVYNNDYLSWYQQKPGQPPKLLIYYASTLASGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCDDAAAYYCAGVKGYSDNNNGFGGGTEVVVKGDPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
29	Clon 14-1 VL CDR1	QASQSVYNNDYLS
30	Clon 14-1 VL CDR2	YASTLAS
31	Clon 14-1 VL CDR3	AGVKGYSDNNNG
32	Clon 14-7 VH	ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAATGTCAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTCGACTTCAGTATCAACTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAGTGGATCGCATGCATTTATACTGGTGATGATGACACTTTCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAACCTGACAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGTGAGAGGTCTATATAGTGGTAGTATTAATAACCTGTGGGGCCAGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
33	Clon 14-7 VH	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCKASGFDFSINYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDDDDTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRGLYSGSINNWLWPGTLTVTVSS

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
34	Clon 14-7 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLT CKASGFD <del>S</del> INYYMCWVRQAPGKLEWIA <del>C</del> IYTGDDDTF YASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRGL YSGSINNLWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPST
		VTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGL YSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSK PTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ DDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIA HQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKV YTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAE DNYKTTPAVLSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSV MHEALHNHYTQKSISRSPGK
23	Clon 14-7 VH CDR1	GFD <del>S</del> INYY
24	Clon 14-7 VH CDR2	YTGDD
25	Clon 14-7 VH CDR3	GLYSGSINNL
35	Clon 14-7 VL	ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGATGCCAGATGTGCGCTTGTGA TGACCCAGACTCCATCCCCTGTGTCTGCAGCTGTGGGA GGCACAGTCACCATCAGTTGCCAGGCCAGTCAGAGTGT TTATAACAACGACTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAAC CAGGGCAGCCTCCCAAACCTCTGATCTATTATGCATCC ACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAG TGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTACCATCAGCGACG TGCAGTGTGACGATGCTGCCGCTTACTATTGTGCAGGC GTAAAGGTTATAGTAATGATAATAATGGTTTCGGCGG AGGGACCGAGGTGGTGGTCAA
36	Clon 14-7 VL	MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGG TVTISCQASQSVYNNDYLSWYQQKPGQPPKLLIYYASTLA SGVSSRFKGS <del>G</del> SGTQFTLTISDVQCDDAAAYYCAGVKGY SNDNNGFGGGTEVVVK
37	Clon 14-7 LC	MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGG TVTISCQASQSVYNNDYLSWYQQKPGQPPKLLIYYASTLA SGVSSRFKGS <del>G</del> SGTQFTLTISDVQCDDAAAYYCAGVKGY SNDNNGFGGGTEVVVKGDPVAPT <del>V</del> LIFPPAADQVATGT TIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADC TYNLSSTLTSTQYN <del>S</del> HKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
29	Clon 14-7 VL CDR1	QASQSVYNNDYLS
30	Clon 14-7 VL CDR2	YASTLAS
31	Clon 14-7 VL CDR3	AGVKGYSDNNG

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
38	Clon 15 VH	ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGT GCTCAAAGGGGTCCAGTGTCAGTCGTTGGAGGAGTCCG GGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTC ACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCACGAGCAACTA CTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC TGGAGTGGGTGCGCGTGCATTTTCTTGGTAGTAGTGGTA ACACTGTCTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTACACC ATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAAT GACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATTTCT
		GTGCGAGAGACTATGTTAATGGTTATGACTACTTTAAC TTGTGGGGCCCAGGCACCTTGGTCACCGTCTCCTCA
39	Clon 15 VH	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVKPGASLTLT CTASGFSFTSNYYMCWVRQAPGKGLEWVACIFLGSSGNT VYANWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCAR <u>DYVNGYDYFNL</u> WGPGLTVTVSS
40	Clon 15 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVKPGASLTLT CTASGFSFTSNYYMCWVRQAPGKGLEWVACIFLGSSGNT VYANWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCAR <u>DYVNGYDYFNL</u> WGPGLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGD TPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVR QSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAP STCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVV STLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQP LEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKN GKAEDNYKTTPAVLDSGYSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVF TCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
41	Clon 15 VH CDR1	GFSFTSNY
42	Clon 15 VH CDR2	FLGSSG
43	Clon 15 VH CDR3	DYVNGYDYFNL

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
44	Clon 15 VL	<p>ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCT  GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCACATTTGCCCAAGTGCT  GACCCAGACTGCATCCCCCGTGCTGCGGCTGTTGGAG  GCACAGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTT  TATAATAAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGG  GCAGCCTCCCAAAGGCCTGATCTATTCTACATCGACTCT  AGATTCTGGGGTCCCATCGCGGTTACAGCGGCAGTGGAT  CTGGGACACAGTTCACCTCACCATCAGCGACGTGCAG  TGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTAT  GATTGTAGTAGTGCTGATTGTAATGCTTTCGGCGGAGG  GACCGAGGTGGTGGTCAAA  MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTASPVSAAVGG  TVTINCQSSQSVYNKNLAWYQQKPGQPPKGLIYSTLDS  GVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSS  <u>ADCNA</u>FGGGTEVVVK  MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTASPVSAAVGG  TVTINCQSSQSVYNKNLAWYQQKPGQPPKGLIYSTLDS  GVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSS  <u>ADCNA</u>FGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTI  VCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCT  YNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC</p>
45	Clon 15 VL	<p>MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTASPVSAAVGG  TVTINCQSSQSVYNKNLAWYQQKPGQPPKGLIYSTLDS  GVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSS  <u>ADCNA</u>FGGGTEVVVK</p>
46	Clon 15 LC	<p>MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTASPVSAAVGG  TVTINCQSSQSVYNKNLAWYQQKPGQPPKGLIYSTLDS  GVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSS  <u>ADCNA</u>FGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTI  VCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCT  YNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC</p>
47	Clon 15 VL CDR1	QSSQSVYNKNLA
48	Clon 15 VL CDR2	STSLDS
49	Clon 15 VL CDR3	LGSYDCSSADCNA
50	Clon 17 VH	<p>ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGT  GCTCAAAGGTGTCCAATGTCAGTCGCTGGAGGAGTCCG  GGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTC  ACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGACAGTTGG  TACTTGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT  GGAGTGGATCGCATGCATTTATACTGGTGATGGTGACA  CTTATTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATCACCATC  TCCAAGACCTCGTCGACCACAGTGACTCTACAAATGAC  CAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTG  CGAGGGGTGCCCAATTTTACTTGTGGGGCCAAGGCACC  CTGGTCACCGTCTCCTCA</p>

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
51	Clon 17 VH	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCTASGFSFSDSWYLCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDDTY YATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARG <u>AQFY</u> LWGQGLVTVSS
52	Clon 17 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCTASGFSFSDSWYLCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDDTY YATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARG <u>AQFY</u> LWGQGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSSSTVT LGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYS LSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT CPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQD DPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAH QDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYT MGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDN YKTPAVLSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH EALHNHYTQKSISRSPGK
53	Clon 17 VH CDR1	GFSFSDSW
54	Clon 17 VH CDR2	YTGDG
55	Clon 17 VH CDR3	GAQFY
56	Clon 17 VL	ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCACATTTGCCAGGTGCT GACCCAGACTCCATCCTCCGTGCTGCAGCTGTGGGAG GCACAGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTT TATGCCAACACCTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTGCATCCA GTCTGGCATCTGGGGTCCACCGCGGTTCAAAGGCAGT GGATCTGGGACACAGTTCGCTCTCACCATCAGCGACGT GCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCA GATATAGTTGTGGTCTTGCTGATTGTGCTGCTTTCGGCG GAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA
57	Clon 17 VL	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGG TVTINCQSSQSVYANTYLSWYQQKPGQPPKQLIY <u>SASSLA</u> SGVPPRFKSGSGTQFALTISDVQCDDAATYYCLGRYSCG LADCAAFGGGTEVVVK
58	Clon 17 LC	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGG TVTINCQSSQSVYANTYLSWYQQKPGQPPKQLIY <u>SASSLA</u> SGVPPRFKSGSGTQFALTISDVQCDDAATYYCLGRYSCG <u>LADCAAFGGGTEVVVK</u> GDPVAPTFLIFPPAADQVATGTV TIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTGIENSKTPQNSADC TYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
59	CDR1	QSSQSVYANTYLS

# ES 3 013 602 T3

(continuación)

5	SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
	60	Clon 17 VL CDR2	SASSLAS
	61	Clon 17 VL CDR3	LGRYSCGLADCAA
10	11	7 VL CDR1 Kabat	QASESVYNSDWLA
	12	7 VL CDR2 Kabat	AASTLAS
	13	7 VL CDR3 Kabat	AGYKSSSTDGIA
15	11	13 VL CDR1 Kabat	QASESVYNSDWLA
	12	13 VL CDR2 Kabat	AASTLAS
	13	13 VL CDR3 Kabat	AGYKSSSTDGIA
20	29	14-1 VL CDR1 Kabat	QASQSVYNNDYLS
	30	14-1 VL CDR2 Kabat	YASTLAS
	31	14-1 VL CDR3 Kabat	AGVKGYSDNNNG
25	29	14-7 VL CDR1 Kabat	QASQSVYNNDYLS
	30	14-7 VL CDR2 Kabat	YASTLAS
	31	14-7 VL CDR3 Kabat	AGVKGYSDNNNG
30	47	15 VL CDR1 Kabat	QSSQSVYNKNLA
	48	15 VL CDR2 Kabat	STSTLDS
	49	15 VL CDR3 Kabat	LGSYDCSSADCNA
35	59	17 VL CDR1 Kabat	QSSQSVYANTYLS
	60	17 VL CDR2 Kabat	SASSLAS
	61	17 VL CDR3 Kabat	LGRYSCGLADCAA
40	62	7 VH CDR1 Kabat	NNGIC
	63	7 VH CDR2 Kabat	CLYVGSSDTTYASWAK
	7	7 VH CDR3 Kabat	NLGL
	62	13 VH CDR1 Kabat	NNGIC
45	63	13 VH CDR2 Kabat	CLYVGSSDTTYASWAK
	7	13 VH CDR3 Kabat	NLGL
	64	14-1 VH CDR1 Kabat	INYYMC
50	65	14-1 VH CDR2 Kabat	CIYTGDDDTFYASWAK
	25	14-1 VH CDR3 Kabat	GLYSGSINNL
	64	14-7 VH CDR1 Kabat	INYYMC
55	65	14-7 VH CDR2 Kabat	CIYTGDDDTFYASWAK
	25	14-7 VH CDR3 Kabat	GLYSGSINNL
	66	15 VH CDR1 Kabat	SNYYMC
60	67	15 VH CDR2 Kabat	CIFLGSSGNTVYANWAK
	43	15 VH CDR3 Kabat	DYVNGYDYFNL
	68	17 VH CDR1 Kabat	DSWYLC
65	69	17 VH CDR2 Kabat	CIYTGDDTTYATWAK

# ES 3 013 602 T3

(continuación)

	SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
5	55	17 VH CDR3 Kabat	GAQFYL
	11	7 VL CDR1 Chothia	QASESVYNSDWLA
10	12	7 VL CDR2 Chothia	AASLAS
	13	7 VL CDR3 Chothia	AGYKSSSTDGIA
	11	13 VL CDR1 Chothia	QASESVYNSDWLA
15	12	13 VL CDR2 Chothia	AASLAS
	13	13 VL CDR3 Chothia	AGYKSSSTDGIA
	29	14-1 VL CDR1 Chothia	QASQSVYNNDYLS
20	30	14-1 VL CDR2 Chothia	YASLAS
	31	14-1 VL CDR3 Chothia	AGVKGYSNDNNG
	29	14-7 VL CDR1 Chothia	QASQSVYNNDYLS
	30	14-7 VL CDR2 Chothia	YASLAS
25	31	14-7 VL CDR3 Chothia	AGVKGYSNDNNG
	47	15 VL CDR1 Chothia	QSSQSVYNKNLA
	48	15 VL CDR2 Chothia	STSTLDS
30	49	15 VL CDR3 Chothia	LGSYDCSSADCNA
	59	17 VL CDR1 Chothia	QSSQSVYANTYLS
	60	17 VL CDR2 Chothia	SASSLAS
35	61	17 VL CDR3 Chothia	LGRYSCGLADCAA
	5	7 VH CDR1 Chothia	GFSFSNN
	6	7 VH CDR2 Chothia	YVGSSD
40	7	7 VH CDR3 Chothia	NLGL
	5	13VH CDR1 Chothia	GFSFSNN
	6	13 VH CDR2 Chothia	YVGSSD
45	7	13 VH CDR3 Chothia	NLGL
	23	14-1 VH CDR1 Chothia	GFDFSINY
	24	14-1 VH CDR2 Chothia	YTGDD
50	25	14-1 VH CDR3 Chothia	GLYSGSINN
	23	14-7 VH CDR1 Chothia	GFDFSINY
	24	14-7 VH CDR2 Chothia	YTGDD
55	25	14-7 VH CDR3 Chothia	GLYSGSINN
	41	15 VH CDR1 Chothia	GFSFSTNY
	42	15 VH CDR2 Chothia	FLGSSG
60	43	15 VH CDR3 Chothia	DYVNGYDYFNL
	53	17 VH CDR1 Chothia	GFSFSDSW
	54	17 VH CDR2 Chothia	YTGDG
65	55	17 VH CDR3 Chothia	GAQFYL



(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
5	11 7 VL CDR1 IMGT	QASESVYNSDWLA
	12 7 VL CDR2 IMGT	AASLAS
	13 7 VL CDR3 IMGT	AGYKSSSTDGIA
10	11 13 VL CDR1 IMGT	QASESVYNSDWLA
	12 13 VL CDR2 IMGT	AASLAS
	13 13 VL CDR3 IMGT	AGYKSSSTDGIA
15	29 14-1 VL CDR1 IMGT	QASQSVYNNDYLS
	30 14-1 VL CDR2 IMGT	YASLAS
	31 14-1 VL CDR3 IMGT	AGVKGYSNDNNG
20	29 14-7 VL CDR1 IMGT	QASQSVYNNDYLS
	30 14-7 VL CDR2 IMGT	YASLAS
	31 14-7 VL CDR3 IMGT	AGVKGYSNDNNG
25	47 15 VL CDR1 IMGT	QSSQSVYNKNLA
	48 15 VL CDR2 IMGT	STSTLDS
	49 15 VL CDR3 IMGT	LGSYDCSSADCNA
30	59 17 VL CDR1 IMGT	QSSQSVYANTYLS
	60 17 VL CDR2 IMGT	SASSLAS
	61 17 VL CDR3 IMGT	LGRYSCGLADCAA
35	70 7 VH CDR 1 IMGT	GFSFSNNGIC
	63 7 VH CDR 2 IMGT	CLYVGSSDTTYASWAK
	7 7 VH CDR 3 IMGT	NLGL
40	70 13 VH CDR 1 IMGT	GFSFSNNGIC
	63 13 VH CDR 2 IMGT	CLYVGSSDTTYASWAK
	7 13 VH CDR 3 IMGT	NLGL
45	71 14-1 VH CDR 1 IMGT	GFDIFSINYYMC
	65 14-1 VH CDR 2 IMGT	CIYTGDDDTFYASWAK
	25 14-1 VH CDR 3 IMGT	GLYSGSINN
50	71 14-7 VH CDR 1 IMGT	GFDIFSINYYMC
	65 14-7 VH CDR 2 IMGT	CIYTGDDDTFYASWAK
	25 14-7 VH CDR 3 IMGT	GLYSGSINN
55	72 15 VH CDR 1 IMGT	GFSFTSNYYMC
	67 15 VH CDR 2 IMGT	CIFLGSSGNTVYANWAK
	43 15 VH CDR 3 IMGT	DYVNGYDYFNL
60	73 17 VH CDR 1 IMGT	GFSFSDSWYLC
	69 17 VH CDR 2 IMGT	CIYTGDDDTFYATWAK
	55 17 VH CDR 3 IMGT	GAQFYL
65	74 FMC 63 VL CDR1 HUMANIZADA	RASQDISKYL

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
75	FMC 63 VL CDR2 HUMANIZADA	HTSRLHS
76	FMC 63 VL CDR3 HUMANIZADA	QQGNTLPYT
77	FMC 63 VH CDR1 Clothia HUMANIZADA	GVSLPDY
78	FMC 63 VH CDR2 Clothia HUMANIZADA	WGSET
79	FMC 63 VH CDR3 HUMANIZADA	HYYYGGSYAMDY
80	FMC 63 VH CDR1 Kabat HUMANIZADA	DYGVS
81	FMC 63 VH CDR2 Kabat/IMGT HUMANIZADA	VIWGSETTYNSALKS
82	FMC 63 VH CDR1 IMGT HUMANIZADA	GVSLPDYGV

**EJEMPLOS**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

**EJEMPLO 1****Generación y cribado de moléculas de unión a antígenos**

Se generaron los anticuerpos monoclonales mediante inmunización de conejos usando el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), conjugado con Fc como inmunógeno. El título se determinó mediante el cribado de sueros policlonales usando Fc como tamiz. Se realizó un cribado secundario usando células T CAR analizadas mediante citometría de flujo. Una vez se hubo alcanzado el título, se sacrificaron los conejos inmunizados y se obtuvieron monoclonales mediante técnicas estándar de generación y subclonación de hibridomas. El cribado final de los subclones de hibridoma se llevó a cabo mediante rondas adicionales de citometría de flujo e inmunohistoquímica (IHC) de células CAR T proliferantes o de sedimentos celulares fijados derivados de células CAR T, respectivamente. Las secuencias de los dos subclones finales seleccionados se determinaron mediante secuenciación de Sanger estándar de los subclones de hibridomas.

Las PBMC se aislaron de leucopaks de donantes sanos (Hemacare™) usando centrifugación de densidad Ficoll-Paque siguiendo las instrucciones del fabricante. Las PBMC se estimularon usando OKT3 (50ng/ml, Miltenyi Biotec™) en medio R10 + IL-2 (300IU/ml, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Dos días después de la estimulación, se generaron células T CAR que presentaban el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) mediante transducción viral de estas células T humanas primarias activadas. La transducción se realizó usando o un retro-vector (vector pMSVG) o un lentivirus (vector pGAR) dependiendo del origen de las CAR usadas en el cribado. La confirmación de la expresión del constructo de CAR y la eficacia de la transducción viral se determinó usando proteína L conjugada con ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los resultados se muestran en las Figuras 1A-1B y 2.

**EJEMPLO 2****Estudios de inmunohistoquímica (IHC)**

Se evaluaron varios anticuerpos divulgados en la presente, (Clones 7 y 13) con respecto a su capacidad para funcionar como reactivos en estudios de inmunohistoquímica (IHC). Para crear los sedimentos celulares fijados para tinción IHC, se centrifugaron ~2e6 células T CAR que presentaban el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1) y se lavaron con PBS. Las células se volvieron a suspender en PBS que contenía 0,45% de paraformaldehído (PFA) y se incubaron en una plataforma de agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, las

células se lavaron una vez más con PBS y se volvieron a suspender en PBS con un 5% de BSA. Los resultados de los experimentos de IHC se muestran en las Figuras 3 y 4A (la Figura 4B muestra los controles), y demuestran que por lo menos los clones 7 y 13 pueden ser útiles en este tipo de experimentos.

## 5 EJEMPLO 3

### Uso de un anticuerpo anti-FMC63 para purificar macromoléculas y células

10 Las moléculas de unión a antígeno divulgadas en la presente son moléculas de unión a antígeno antiidiotípicas y reconocen un epítipo en el scFv FMC63 anti-CD19. Una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo) divulgada en la presente puede usarse por tanto para purificar una molécula, como el scFv FMC63 anti-CD19, macromolécula, polímero, célula, material, etc., que muestra un epítipo que es reconocido por las moléculas de unión a antígeno divulgadas en la presente.

15 En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente (por ejemplo, los clones 7, 13, 14-1, 14-7, 15 y/o 17 y fragmentos de los mismos) puede unirse a perlas, unirse o asociarse a una resina, que puede disponerse en una columna u otra estructura. Una muestra que comprende una molécula que contiene todo o un fragmento del scFv FMC63 anti-CD19 puede luego ponerse en contacto con las perlas, resina, etc. a las que se unió la molécula de unión a antígeno o con las que se asoció una molécula de unión a antígeno. Esto permite la  
20 formación de un complejo de asociación o unión que comprende la molécula de unión a antígeno y la molécula que comprende todo o un fragmento del scFv FMC63 anti-CD19. A continuación, las perlas o la resina pueden lavarse con una solución adecuada, como una solución tampón (por ejemplo, PBS, HEPES, MOPS, Tris, Tricina, etc.) con un pH seleccionado para mantener la estabilidad de la molécula que comprende todo o un fragmento del scFv FMC63 anti-CD19. El lavado puede eliminar componentes no deseados y no unidos de la muestra. Después del paso de lavado,  
25 la molécula que comprende la totalidad o un fragmento del scFv FMC63 anti-CD19 puede eluirse de las moléculas de unión a antígeno usando un tampón de elución y condiciones seleccionadas para alterar cualquier complejo de asociación o unión formado. Ejemplos de tampones de elución adecuados incluyen glicina 0,1M, pH 2,5-3,0, y ácido cítrico 0,1M, pH 3,0, trietilamina o trietanolamina 50-100mM, pH 11,5, cloruro de magnesio 3,5-4,0M, pH 7,0 en Tris 10mM, guanidina 2-6M, y urea 2-8M. Durante el paso de elución, se recogen las moléculas, células y partes de interés eluidas que comprenden todo o un fragmento del scFv FMC63 anti-CD19, y la pureza puede comprobarse  
30 posteriormente pasando una muestra por un gel de poliacrilamida SDS.

En otra realización, una molécula de unión a antígeno puede disponerse en solución con cualquier entidad molecular que muestre el epítipo, y purificarse a partir de una población mixta de moléculas, células, etc. y eluirse de  
35 las perlas, resina o anticuerpo libre lavando con cloruro sódico 300-500 mM o bajando el pH y neutralizando con Tris 1 M, para proteínas, o tampón fosfato. Posteriormente, puede usarse la diálisis para devolver los materiales a las condiciones tampón deseadas.

En algunas realizaciones, las células que muestran una molécula que comprende todo o un fragmento del  
40 scFv FMC63 anti-CD19 pueden incubarse con perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS) con las que se ha asociado una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente. Preferiblemente, la incubación se realiza en condiciones que permitan la formación de complejos/asociaciones de unión, como en condiciones fisiológicas, en presencia de un medio seleccionado para este propósito (por ejemplo, RPMI-1640).

45 Las células unidas por las perlas (que presentarán moléculas que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19) se separan entonces de las células que no presentan una molécula que comprende el scFv FMC63 anti-CD19 o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, las perlas pueden lavarse con medios, como RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS, en presencia de un imán.

50 Las células seleccionadas, es decir, aquellas que presentan moléculas que comprenden el scFv FMC63 anti-CD19 pueden separarse luego de las perlas: En primer lugar, las células seleccionadas se cultivan en medios. Después de cultivar las células durante 48 horas, las perlas magnéticas pueden separarse de las células en solución y desecharse, dejando una población pura de células que expresan la molécula deseada.

55 En una realización alternativa, las perlas no son magnéticas, y en esta realización los pasos anteriores también pueden ser seguidos y adaptados para mantener la integridad celular, pero también para permitir la separación de células unidas a perlas de células no unidas a perlas.

60 En otra realización alternativa, una molécula de unión a antígeno divulgada en la presente (por ejemplo, los clones 7, 13, 14-1, 14-7, 15 y/o 17 y fragmentos de los mismos) puede etiquetarse con His (es decir, marcarse con una secuencia corta de polihistidina), facilitando de este modo la separación de células usando una resina que comprende un ion de metal de transición como  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , que están inmovilizados en la resina. A continuación, las moléculas de unión a antígeno pueden incubarse con células que se sabe o se sospecha que expresan la SEQ ID NO: 1 en condiciones adecuadas para la formación de complejos que comprendan las células y  
65 las moléculas de unión a antígeno. Después de la incubación, las células se ponen en contacto con la resina, que

puede disponerse en una estructura sólida, como una placa perforada, una columna u otra estructura. A continuación, los complejos molécula de unión a antígeno-célula pueden separarse entre sí mediante lavado con imidazol, que tendrá una concentración superior a la de cualquier imidazol incluido en cualquier solución usada en la formación de los complejos de unión. Las células eluidas pueden centrifugarse, lavarse en RPMI u otro medio adecuado y volver a suspenderse en el medio.

#### EJEMPLO 4

##### Activación de células T CAR-positivas usando una molécula de unión a antígeno anti-FMC63

También se proporciona un método de activación de células T CAR-positivas que presentan una molécula que comprende un idiotipo específico reconocido por una molécula de unión a antígeno específica (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno que reconoce el scFv FMC63 anti-CD19 (SEQ ID NO: 1), como los divulgados en la presente: Clon 7, 13, 14-1, 14-7, 15 y/o 17, y fragmentos de los mismos). Este método puede adaptarse para cualquier anticuerpo que reconozca una proteína de interés en una célula T que contenga un dominio de activación, como un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprenda la SEQ ID NO: 1. La activación puede lograrse usando anticuerpos unidos a placas, unidos a perlas, unidos a polímeros o de otra forma que reconozcan específicamente un componente extracelular del CAR o molécula similar.

En algunas realizaciones, el método puede llevarse a cabo de la siguiente manera: en primer lugar se recubre una placa tratada con cultivo de tejidos de 12 pocillos con 1 ml de una solución de 1,5 µg/ml de una molécula de unión a antígeno scFv FMC63 anti-CD19 divulgada en la presente, que se ha diluido en HBSS u otro tampón fosfato, y se coloca en una incubadora a 37 C durante 2 horas. A continuación, la placa se lava tres veces con HBSS u otro tampón de fosfato con un pH, fuerza iónica, etc. adecuados. A continuación, se añaden células T CAR positivas en medio OpTmizer (con suplementos) o medio RPMI-1640 con 10% de FBS a la placa tratada con cultivo tisular. A continuación, las células se cultivan a 37 C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de 2 días, se examinan las células para determinar cualquier incremento en el porcentaje de células CAR-positivas. Esta determinación puede hacerse identificando cualquier aumento en la expresión de cualquier marcador de superficie celular y/o interno, incluyendo, pero no limitado a 4-1BB, CD69, CD25, PD-1, y Ki-67.

#### EJEMPLO 5

##### Generación de secuencias humanizadas a partir de anticuerpos de conejo

Puede usarse el software Molecular Operating Environment (MOE) desarrollado por Chemical Computing Group (CCG) para generar alineaciones entre los clones de anticuerpos de conejo 7, 13, 14-1, 14-7, 15 y 17 y pares de cadenas variables ligeras y pesadas, VL y VH, respectivamente de dos bases de datos:

- (1) La base de datos humana Abysis: una base de datos de aproximadamente 2000 pares de secuencias VL/VH humanas conocidas de IMGT-LigM DB; y
- (2) Una base de datos de la línea germinal humana: una base de datos de secuencias de la línea germinal.

Los modelos humanizados muestran las mejores alineaciones de secuencias (mayor identidad con los dominios VL y VH) con menos huecos. Los 100 mejores pares de anticuerpos de cada base de datos humana pueden exportarse y agruparse usando kClust (Hauser, Mayer, & Soding, (2013) *BMC Bioinformatics*, 248). Pueden construirse tablas para las secuencias VL y VH de cada uno de los anticuerpos, con secuencias de cada una de las dos bases de datos agrupadas al 90% y al 95%.

#### EJEMPLO 6

##### Citometría de flujo de CAR FMC63 humanizado

Se identificaron constructos CAR FMC63 humanizados que comprenden bucles CDR conservados (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos definidas en la Tabla C y D) y se unen a CD19. Se generaron células Jurkat que expresaban FMC63 y constructos CAR FMC63 humanizados mediante transducción con lentivirus portadores de los constructos respectivos. Los anticuerpos monoclonales 14-1, 15 y 17-4 se incubaron con células Jurkat que expresaban CAR y se detectaron con un anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-conejo conjugado con FITC (Thermo). Se usó un anticuerpo reactivo contra todos estos constructos de CAR como control para verificar la expresión (Figura 22, fila superior). El clon 15 se une a los aminoácidos comunes en los bucles CDR de FMC63 y todos los constructos humanizados, pero no muestra reactividad frente a células Jurkat transducidas simuladas. (Figura 22). El anticuerpo secundario solo y los controles de transducción simulada no muestran tinción de fondo.

**Tabla C.** CDR para la región variable de la cadena ligera (VL) del FMC63anti-CD19 humanizado

<b>Secuencia</b> (Convención)	<b>CDR1</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>CDR2</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>CDR3</b>	<b>SEQ ID NO</b>
VL (Chothia)	RASQDISKYL N	74	HTSRLH S	75	QQGNTLPY T	76
VL (Kabat)	RASQDISKYL N	74	HTSRLH S	75	QQGNTLPY T	76
VL (IMGT)	RASQDISKYL N	74	HTSRLH S	75	QQGNTLPY T	76

**Tabla D.** CDR para la región variable de la cadena pesada (VH) del FMC63anti-CD19 humanizado

<b>Secuencia</b> (Convención)	<b>CDR1</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>CDR2</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>CDR3</b>	<b>SEQ ID NO</b>
VH (Chothia)	GVSLPDY	77	WGSET	78	HYYYGGSYAM DY	79
VH (Kabat)	DYGVS	80	VIWGSETTYNSAL KS	81	HYYYGGSYAM DY	79
VH (IMGT)	GVSLPDYGV S	82	VIWGSETTYNSAL KS	81	HYYYGGSYAM DY	79

# REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a antígeno aislada que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 de una molécula que comprende dicha secuencia de aminoácidos, en donde la molécula de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL),

dicha VH comprendiendo una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 y una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; y

dicha VL comprendiendo una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29, una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

2. La molécula de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 21.

3. La molécula de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 27.

4. La molécula de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en un marcador fluorescente, un compuesto fotocrómico, un marcador fluorescente proteínico, un marcador magnético, un radiomarcador y un hapteno.

5. Un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5.

7. Una célula que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6.

8. Una composición que comprende la molécula de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o células que comprenden polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

# No transducidas

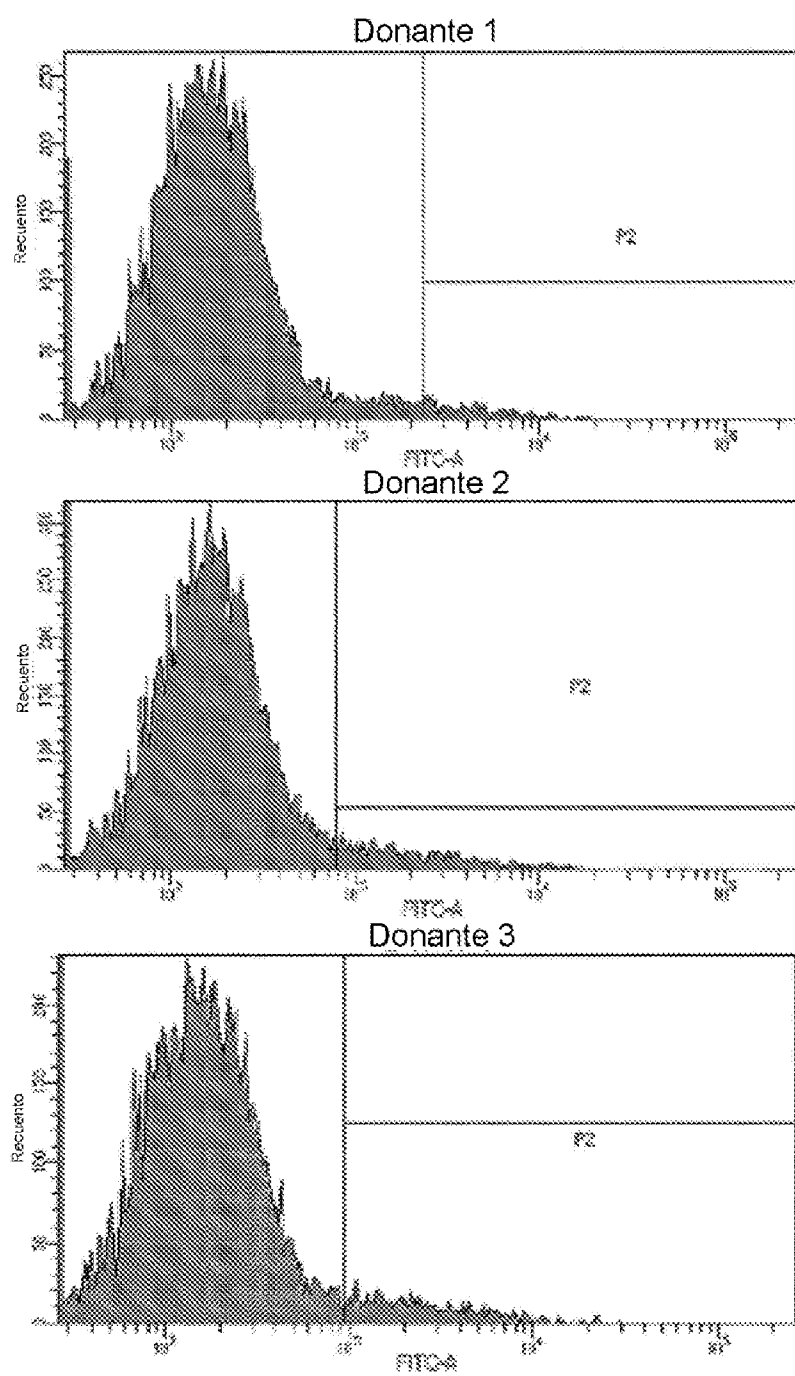
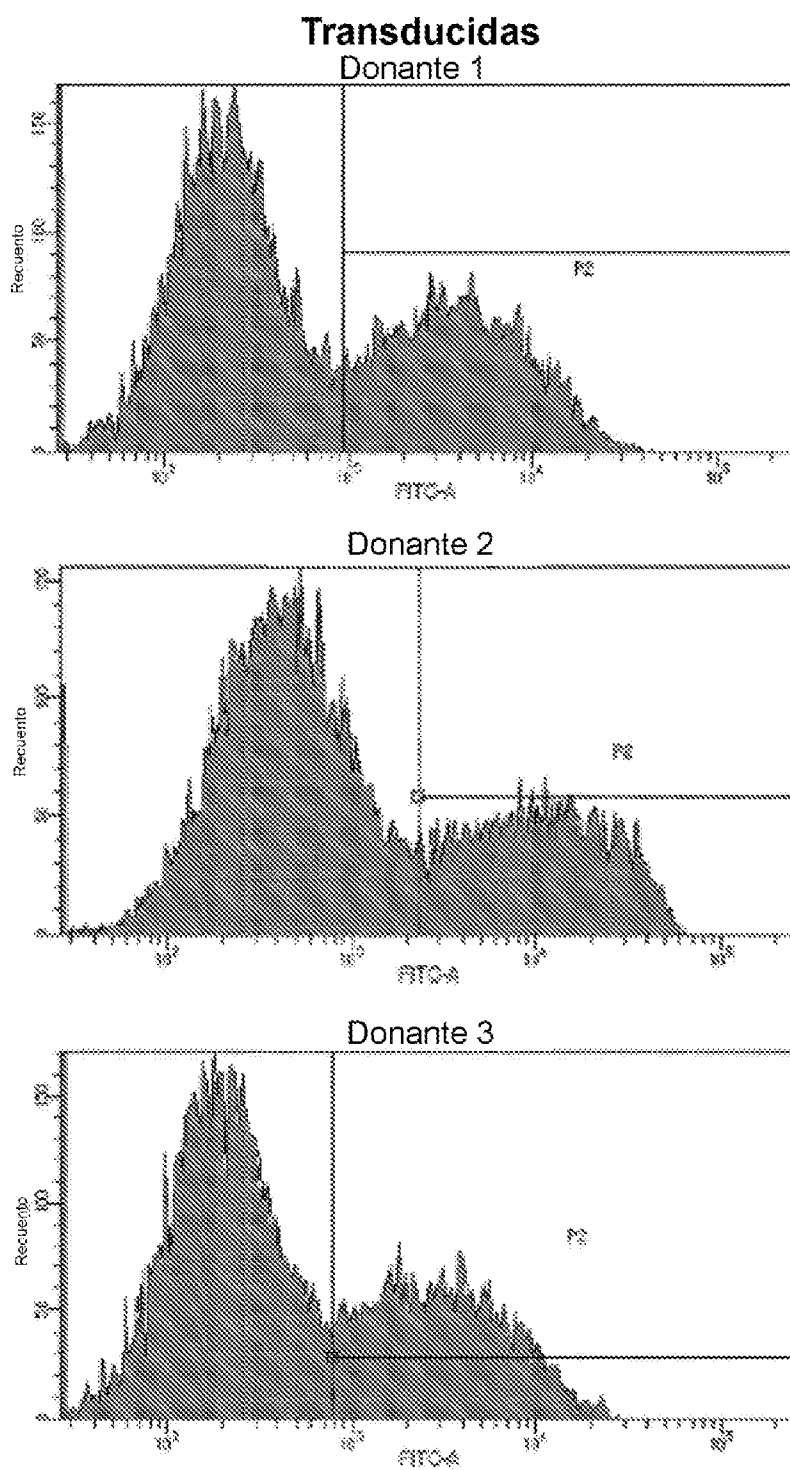


Figura 1A



**Figura 1B**



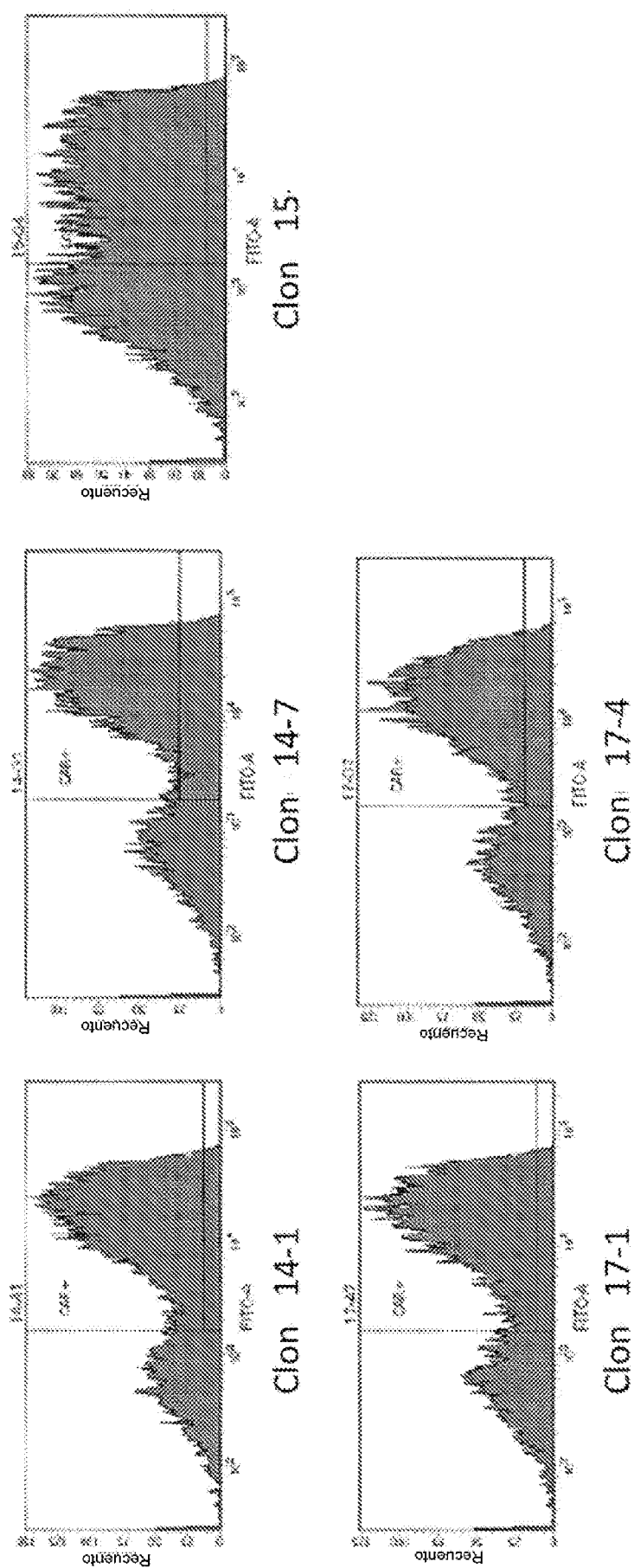
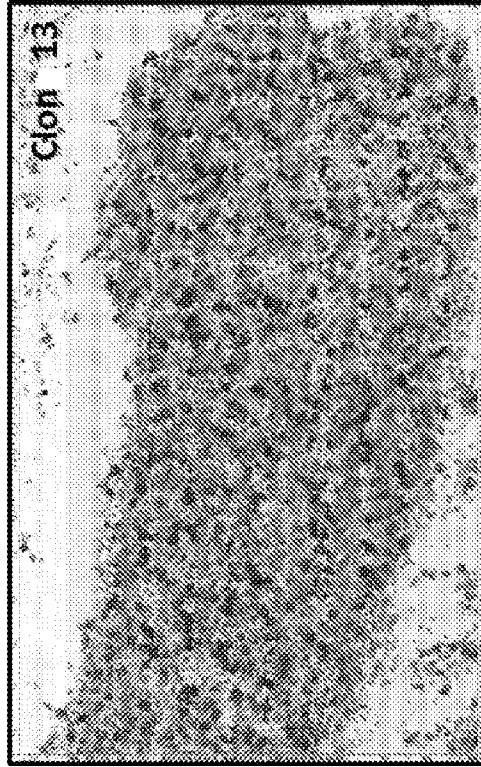


Figura 2

Células T CAR CD19



Células T CAR CD19

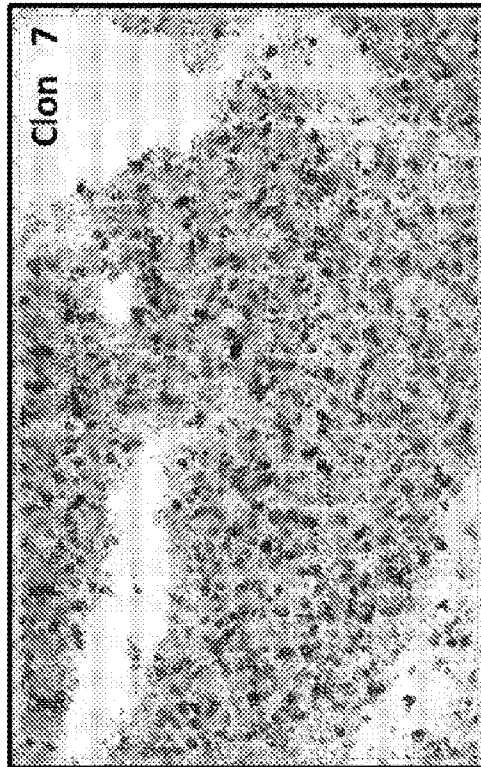
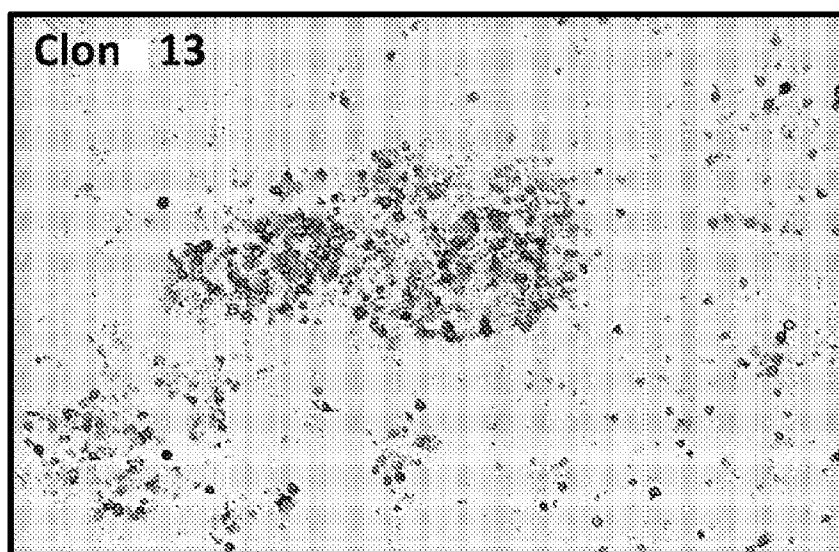
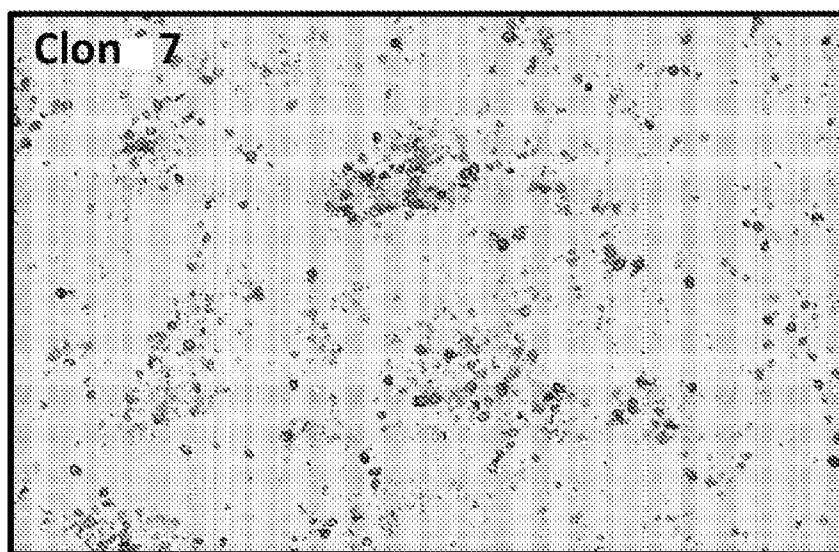


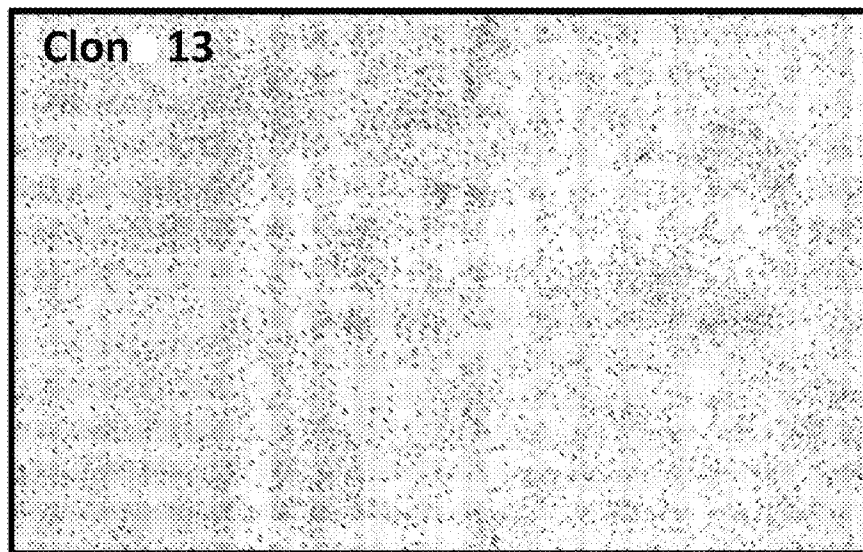
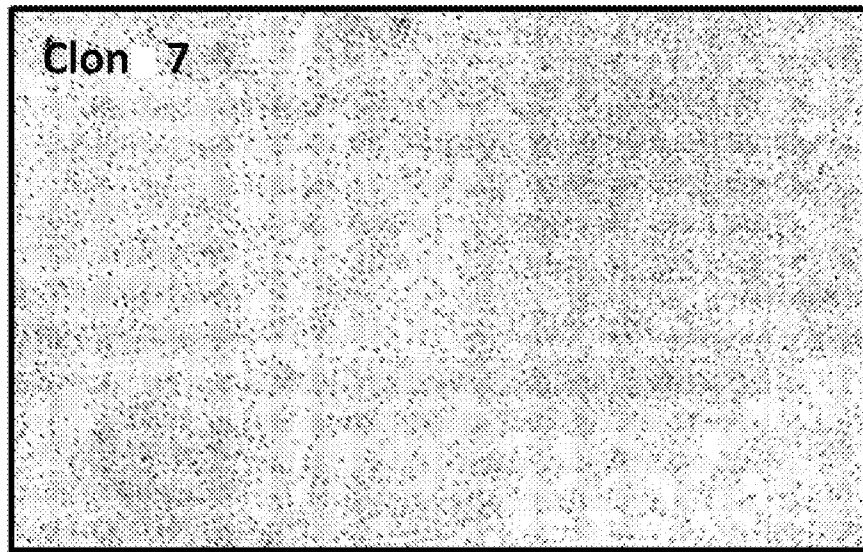
Figura 3

**Células T CAR CD19**



**Figura 4A**

**Control de PBMC**



**Figura 4B**

Clon 7 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCCAGGAGCAGCT  
GGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGAGGAACCCCTGACAGTCACCTGCAAAGCCTCTGGA  
TTCTCCTTCAGTAACAATGGAATTTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGG  
ATGTCTTTATGTTGGTAGTAGTGATAACCTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTC  
CAAAGCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATT  
TCTGTACGATAAATCTCGGCTTGTGGGGCCCCGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 2)

Clon 7 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLAVLKGVQCQEQLLEESGGDLVKPGGTLTVTCKASGFSFSNNGICWVRQAPGKGLEWIGCL  
YVGSSDTTYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCTINLGLWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:  
3)

Clon 7 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLAVLKGVQCQEQLLEESGGDLVKPGGTLTVTCKASGFSFSNNGICWVRQAPGKGLEWIGCL  
YVGSSDTTYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCTINLGLWGPGLTVTVSSGQPKAPSVFPL  
APCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTNCVA  
HPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQDDPEVQFTWYI  
NNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTM  
GPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSLSVPTSEWQRGDVF  
TCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 4)

Clon 7 VH CDR1 AA

GFSFSN (SEQ ID NO: 5)

Clon 7 VH CDR2 AA

YVGSSD (SEQ ID NO: 6)

Clon 7 VH CDR3 AA

NLGL (SEQ ID NO: 7)

**Figura 5**

Clon 7 VL ADN

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCACATTTGCC  
ATCGTGGTGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAG  
GCCAGTGAGAGTGTTTATAATAGCGACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA  
GCAACTGATCTATGCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGCTTCAAAGGCAGTGGATCTGG  
GACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGATGTGGTGTGTGACGATGCTGCCACTTATTATTGTGCAGGATA  
TAAAAGTAGTAGTACTGATGGGATTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (SEQ ID NO:  
8)

Clon 7 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQ  
LIYAASTLASGVPSRFRKGS~~SG~~SGTQFTLTISDVVCDDAATYYCAGYKSSSTDGIAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:  
9)

Clon 7 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQ  
LIYAASTLASGVPSRFRKGS~~SG~~SGTQFTLTISDVVCDDAATYYCAGYKSSSTDGIAFGGGTEVVVKGDPVAPTCLI  
FPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYN  
KEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 10)

Clon 7 VL CDR1 AA

QASESVYNSDWLA (SEQ ID NO: 11)

Clon 7 VL CDR2 AA

AASTLAS (SEQ ID NO: 12)

Clon 7 VL CDR3 AA

AGYKSSSTDGIA (SEQ ID NO: 13)

**Figura 6**

Clon 13 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGGAGCAGCT  
GGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGAGGAACCTGACAGTCACCTGCAAAGCCTCTGGA  
TTCTCCTTCAGTAACAATGGAATTTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGG  
ATGTCTTTATGTTGGTAGTAGTGATAACCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTC  
CAAAAGCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATT  
TCTGTACGATAAATCTCGGCTTGTGGGGCCCCGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 14)

Clon 13 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLEESGGDLVKPGGTLVTCKASGFSFSNNGICWVRQAPGKGLEWIGCL  
YVGSSDTTYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCTINNLGLWGPGLVTVSS (SEQ ID NO:  
15)

Clon 13 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLEESGGDLVKPGGTLVTCKASGFSFSNNGICWVRQAPGKGLEWIGCL  
YVGSSDTTYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCTINNLGLWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPL  
APCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVA  
HPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYI  
NNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTM  
GPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDSGSGYFLYSKLSVPTSEWQRGDVF  
TCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 16)

Clon 13 VH CDR1 AA

GFSFSNN (SEQ ID NO: 5)

Clon 13 VH CDR2 AA

YVGSSD (SEQ ID NO: 6)

Clon 13 VH CDR3 AA

NLGL (SEQ ID NO: 7)

**Figura 7**

Clon 13 VL ADN

ATGGACACGAGGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCACACTTGC  
CATCGTGGTGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCA  
GGCCAGTGAGAGTGTTTATAATAGCGACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCA  
AGCAACTGATCTATGCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGCTTCAAAGGCAGTGGATCTG  
GGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGATGTGGTGTGTGACGATGCTGCCACTTATTATTGTGCAGGAT  
ATAAAAGTAGTAGTACTGATGGGATTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (SEQ ID  
NO: 17)

Clon 13 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQ  
LIYAASTLASGVPSRFGSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYYCAGYKSSTDGIAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:  
18)

Clon 13 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATLAIVVTQTPSSKSVPVGGTVTINCQASESVYNSDWLAWYQQKPGQPPKQ  
LIYAASTLASGVPSRFGSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYYCAGYKSSTDGIAFGGGTEVVVKGDPVAPTCLI  
FPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYNH  
KEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 19)

Clon 13 VL CDR1 AA

QASESVYNSDWLA (SEQ ID NO: 11)

Clon 13 VL CDR2 AA

AASTLAS (SEQ ID NO: 12)

Clon 13 VL CDR3 AA

AGYKSSTDGIA (SEQ ID NO: 13)

**Figura 8**



Clon 14-1 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCCAGGAGCAGCT  
GGAGGAGTCCGGGGGAGGCCCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTGCAAAGCCTCTGGA  
TTCGACTTCAGTATCAACTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTTGGAGTGGAT  
CGCATGCATTTATACTGGTGATGATGACACTTTCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTC  
CAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAACTGAACAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTT  
CTGTGTGAGAGGTCTATATAGTGGTAGTATTAATAACCTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTC  
CTCA

(SEQ ID NO: 20)

Clon 14-1 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLAVLKGVCQCEQLEESGGGLVKPGASLTLTCKASGFDFSINYYMCWVRQAPGKGLEWIA  
CIYTGDDDTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRGLYSGSINNLWGPGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 21)

Clon 14-1 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLAVLKGVCQCEQLEESGGGLVKPGASLTLTCKASGFDFSINYYMCWVRQAPGKGLEWIA  
CIYTGDDDTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRGLYSGSINNLWGPGLTVTVSSGQPKA  
PSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPV  
TCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIAPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQ  
FTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEP  
KVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSYFLYSKLSVPTSEWQ  
RGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 22)

Clon 14-1 VH CDR1 AA

GFDFSIN (SEQ ID NO: 23)

Clon 14-1 VH CDR2 AA

YTGDD (SEQ ID NO: 24)

Clon 14-1 VH CDR3 AA

GLYSGSINNL (SEQ ID NO: 25)

**Figura 9**

Clon 14-1 VL ADN

ATGGACACGAGGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATGCCAGATGTGC  
GCTTGTGATGACCCAGACTCCATCCCCTGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAGTTGCCA  
GGCCAGTCAGAGTGTTTATAACAACGACTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCA  
AACTCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTG  
GGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCGCTTACTATTGTGCAGGC  
GTTAAAGGTTATAGTAATGATAATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (SEQ ID  
NO: 26)

Clon 14-1 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGT VTISQASQSVYNNDYLSWYQQKPGQPPK  
LLIYYASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAAAYYCAGVKGYSNDNNGFGGGTEVVVK (SEQ ID  
NO: 27)

Clon 14-1 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGT VTISQASQSVYNNDYLSWYQQKPGQPPK  
LLIYYASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAAAYYCAGVKGYSNDNNGFGGGTEVVVK KGDPVAP  
TVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTG IENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQY  
NSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO:28)

Clon 14-1 VL CDR1 AA

QASQSVYNNDYLS (SEQ ID NO: 29)

Clon 14-1 VL CDR2 AA

YASTLAS (SEQ ID NO: 30)

Clon 14-1 VL CDR3 AA

AGVKGYSNDNNG (SEQ ID NO: 31)

**Figura 10**

Clon 14-7 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAATGTCAGTCGCTGGA  
GGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTCTG  
ACTTCAGTATCAACTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTTGGAGTGGATCGCA  
TGCATTTATACTGGTGATGATGACACTTTCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAAA  
ACCTCGTCGACCACGGTGACTCTACAACCTGAACAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGT  
GTGAGAGGTCTATATAGTGGTAGTATTAATAACCTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA  
(SEQ ID NO: 32)

Clon 14-7 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCKASGFDFSINYYMCWVRQAPGKGLEWIACIY  
TGDDDTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRGLYSGSINNLWGPGTLTVTVSS (SEQ ID  
NO: 33)

Clon 14-7 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCKASGFDFSINYYMCWVRQAPGKGLEWIACIY  
TGDDDTFYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQLNSLTAADTATYFCVRGLYSGSINNLWGPGTLTVTVSSGQPKAP  
SVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVT  
CNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQF  
TWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPK  
VYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSGYFLYSKLSVPTSEWQR  
GDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 34)

Clon 14-7 VH CDR1 AA

GFDFSINY (SEQ ID NO: 23)

Clon 14-7 VH CDR2 AA

YTGDD (SEQ ID NO: 24)

Clon 14-7 VH CDR3 AA

GLYSGSINNL (SEQ ID NO: 25)

**Figura 11**

Clon 14-7 VL ADN

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATGCCAGATGTGC  
GCTTGTGATGACCCAGACTCCATCCCCTGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAGTTGCCA  
GGCCAGTCAGAGTGTTTATAACAACGACTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCA  
AACTCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTG  
GGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCGCTTACTATTGTGCAGGC  
GTAAAGGTTATAGTAATGATAATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (SEQ ID  
NO: 35)

Clon : 14-7 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQASQSVYNNDYLSWYQQKPGQPPK  
LLIYYASTLASGVSSRFKGS GSGTQFTLTISDVQCDDAAAYYCAGVKGYSNDNNGFGGGTEVVVK (SEQ ID  
NO: 36)

Clon 14-7 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPDARCALVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQASQSVYNNDYLSWYQQKPGQPPK  
LLIYYASTLASGVSSRFKGS GSGTQFTLTISDVQCDDAAAYYCAGVKGYSNDNNGFGGGTEVVVKGDVPVAP  
TVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQY  
NSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 37)

Clon 14-7 VL CDR1 AA

QASQSVYNNDYLS (SEQ ID NO: 29)

Clon 14-7 VL CDR2 AA

YASTLAS (SEQ ID NO: 30)

Clon 14-7 VL CDR3 AA

AGVKGYSNDNNG (SEQ ID NO: 31)

**Figura 12**

Clon 15 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGGGTCCAGTGTGAGTCGTTGGA  
GGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCT  
CCTTCACGAGCAACTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCG  
GTGCATTTTTCTTGGTAGTAGTGGTAACACTGTCTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTC  
CAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTATTT  
CTGTGCGAGAGACTATGTTAATGGTTATGACTACTTTAACTTGTGGGGCCAGGCACCTTGGTCACCGT  
CTCCTCA (SEQ ID NO: 38)

Clon 15 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFTSNYYMCWVRQAPGKGLEWVACI  
FLGSSGNTVYANWAKGRFTISKTSTTTVTLQMTSLTVADTATYFCARDYVNGYDYFNLWGPGTLTVSS  
(SEQ ID NO: 39)

Clon 15 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFTSNYYMCWVRQAPGKGLEWVACI  
FLGSSGNTVYANWAKGRFTISKTSTTTVTLQMTSLTVADTATYFCARDYVNGYDYFNLWGPGTLTVSSGQ  
PKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSS  
QPVTNCVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDP  
EVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQP  
LEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSGYFLYSLSVPTSE  
WQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 40)

Clon 15 VH CDR1 AA

GFSFTSNY (SEQ ID NO: 41)

Clon 15 VH CDR2 AA

FLGSSG (SEQ ID NO: 42)

Clon 15 VH CDR3 AA

DYVNGYDYFNL (SEQ ID NO: 43)

**Figura 13**

Clon 15 VL ADN

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCACATTTGCC  
CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTGCGGCTGTTGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCA  
GTCCAGTCAGAGTGTTTATAATAAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAAG  
GCCTGATCTATTCTACATCGACTCTAGATTCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA  
CACAGTTCACCTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTT  
ATGATTGTAGTAGTGCTGATTGTAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (SEQ ID NO:  
44)

Clon 15 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTASPVSAAVGGTGTINCQSSQSVYNKNLAWYQQKPGQPPKG  
LIYSTSTLDSGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSSADCNAFGGGTEVVVK (SEQ ID  
NO: 45)

Clon 15 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTASPVSAAVGGTGTINCQSSQSVYNKNLAWYQQKPGQPPKG  
LIYSTSTLDSGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSSADCNAFGGGTEVVVKGDPVAPT  
VLIFPPAADQVATGVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYN  
SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 46)

Clon 15 VL CDR1 AA

QSSQSVYNKNLA (SEQ ID NO: 47)

Clon 15 VL CDR2 AA

STSTLDS (SEQ ID NO: 48)

Clon 15 VL CDR3 AA

LGSYDCSSADCNA (SEQ ID NO: 49)

**Figura 14**

Clon 17 VH ADN

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAATGTCAGTCGCTGGA  
GGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCT  
CCTTCAGTGACAGTTGGTACTTGTGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGC  
ATGCATTTATACTGGTGATGGTGACACTTATTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAA  
GACCTCGTCGACCACAGTGACTCTACAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTG  
TGCGAGGGGTGCCCAATTTTACTTGTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:  
50)

Clon 17 VH AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCTASGFSFSDSWYLCWVRQAPGKGLEWIACIY  
TGDGDTYATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGGAQFYLWGQGLTVTVSS (SEQ ID  
NO: 51)

Clon 17 HC AA (CDR subrayadas)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGASLTLTCTASGFSFSDSWYLCWVRQAPGKGLEWIACIY  
TGDGDTYATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGGAQFYLWGQGLTVTVSSGQPKAPSVF  
PLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNV  
AHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYI  
NNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTM  
GPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVF  
TCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 52)

Clon 17 VH CDR1 AA

GFSFSDSW (SEQ ID NO: 53)

Clon 17 VH CDR2 AA

YTGDG (SEQ ID NO: 54)

Clon 17 VH CDR3 AA

GAQFYL (SEQ ID NO: 55)

**Figura 15**

Clon 17 VL ADN

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCACATTTGCC  
CAGGTGCTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCA  
GTCCAGTCAGAGTGTTTATGCCAACACCTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA  
GCAACTGATCTATTCTGCATCCAGTCTGGCATCTGGGGTCCCACCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTG  
GGACACAGTTCGCTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCA  
GATATAGTTGTGGTCTTGCTGATTGTGCTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (SEQ ID  
NO: 56)

Clon 17 VL AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGGTVTINCQSSQSVYANTYLSWYQQKPGQPPKQ  
LIYSASSLASGVPPRFRKSGSGTQFALTISDVQCDDAATYYCLGRYSCGLADCAAFGGGTEVVVK (SEQ ID  
NO: 57)

Clon 17 LC AA (CDR subrayadas)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGGTVTINCQSSQSVYANTYLSWYQQKPGQPPKQ  
LIYSASSLASGVPPRFRKSGSGTQFALTISDVQCDDAATYYCLGRYSCGLADCAAFGGGTEVVVKGDPVAPT  
VLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYN  
SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 58)

Clon 17 VL CDR1 AA

QSSQSVYANTYLS (SEQ ID NO: 59)

Clon 17 VL CDR2 AA

SASSLAS (SEQ ID NO: 60)

Clon 17 VL CDR3 AA

LGRYSCGLADCAA (SEQ ID NO: 61)

**Figura 16**



7_VH	ME	IG	LR	WL	LL	LV	AV	LV	KG	VQ	CC	QE	QL	EE	SG	GG	LV	KP	GG	TL	TV	TC	KA	SG	FS	SN	NG	-	IC	WV	RQ	AP	GG	GL	EW	IG
13_VH	ME	IG	LR	WL	LL	LV	AV	LV	KG	VQ	CC	QE	QL	EE	SG	GG	LV	KP	GG	TL	TV	TC	KA	SG	FS	SN	NG	-	IC	WV	RQ	AP	GG	GL	EW	IG
14_1_VH	ME	IG	LR	WL	LL	LV	AV	LV	KG	VQ	CC	QE	QL	EE	SG	GG	LV	KP	GA	SL	TL	TC	KA	SG	FS	SN	NG	-	IC	WV	RQ	AP	GG	GL	EW	IG
14_7_VH	ME	IG	LR	WL	LL	LV	AV	LV	KG	VQ	CC	QE	QL	EE	SG	GG	LV	KP	GA	SL	TL	TC	KA	SG	FS	SN	NG	-	IC	WV	RQ	AP	GG	GL	EW	IG
15_VH	ME	IG	LR	WL	LL	LV	AV	LV	KG	VQ	CC	QE	QL	EE	SG	GG	LV	KP	GA	SL	TL	TC	KA	SG	FS	SN	NG	-	IC	WV	RQ	AP	GG	GL	EW	IG
17_VH	ME	IG	LR	WL	LL	LV	AV	LV	KG	VQ	CC	QE	QL	EE	SG	GG	LV	KP	GA	SL	TL	TC	KA	SG	FS	SN	NG	-	IC	WV	RQ	AP	GG	GL	EW	IG
7_VH	LY	VG	SS	DT	TY	Y	A	SW	A	KG	RF	TI	SK	SS	ST	TV	TLO	MT	SL	TV	AD	TA	TY	FC	TI	NL	-	G	-	-	-	-	-	-	-	
13_VH	LY	VG	SS	DT	TY	Y	A	SW	A	KG	RF	TI	SK	SS	ST	TV	TLO	MT	SL	TV	AD	TA	TY	FC	TI	NL	-	G	-	-	-	-	-	-	-	
14_1_VH	LY	IG	-	GG	DT	TY	Y	A	SW	A	KG	RF	TI	SK	TS	ST	TV	TLO	NS	LT	AD	TA	TY	FC	VR	GL	Y	SG	-	SI	NN	LW	GP	GL	TV	SS
14_7_VH	LY	IG	-	GG	DT	TY	Y	A	SW	A	KG	RF	TI	SK	TS	ST	TV	TLO	NS	LT	AD	TA	TY	FC	VR	GL	Y	SG	-	SI	NN	LW	GP	GL	TV	SS
15_VH	LY	IG	SG	NT	TY	Y	A	NW	A	KG	RF	TI	SK	TS	ST	TV	TLO	MT	SL	TV	AD	TA	TY	FC	AR	DY	UN	GY	-	DI	YF	NL	WGP	GL	TV	SS
17_VH	LY	IG	-	GG	DT	TY	Y	A	TW	A	KG	RF	TI	SK	TS	ST	TV	TLO	MT	SL	TV	AD	TA	TY	FC	AR	DY	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 17A

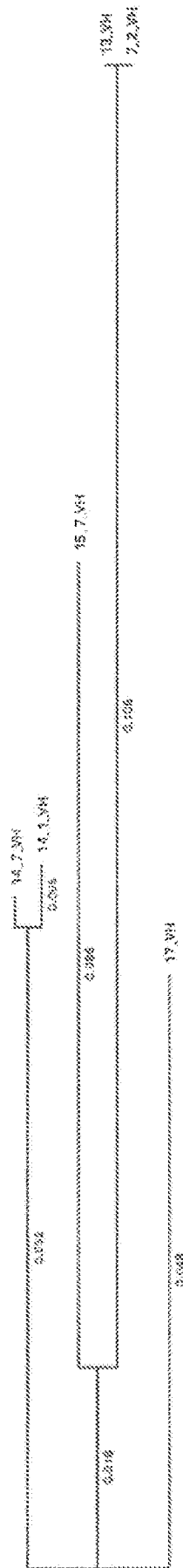


Figure 17B

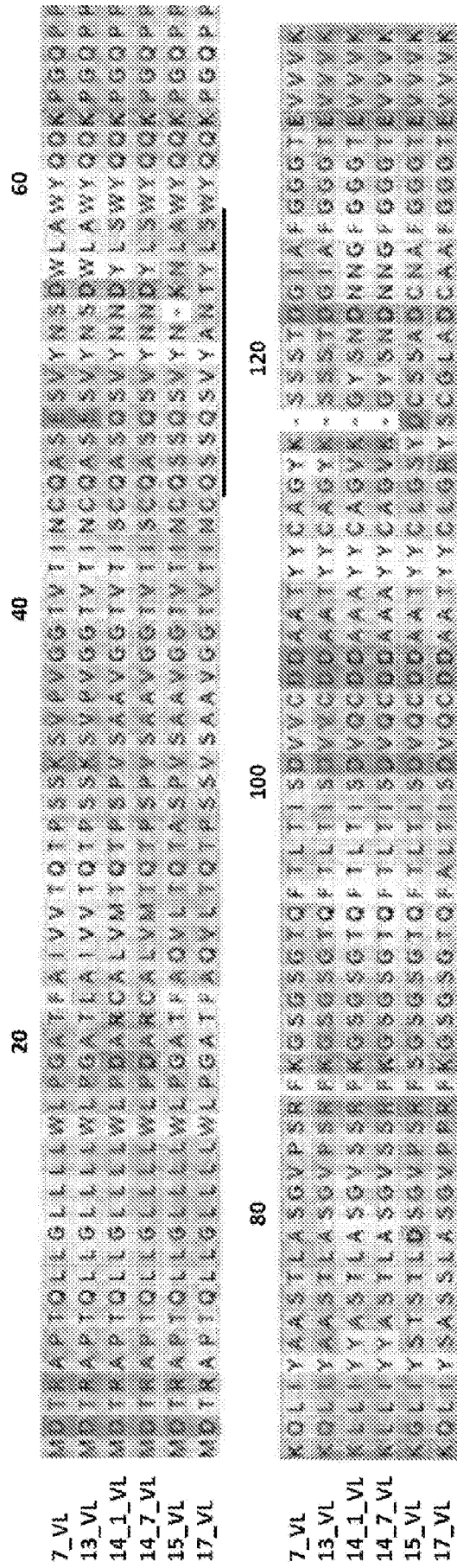
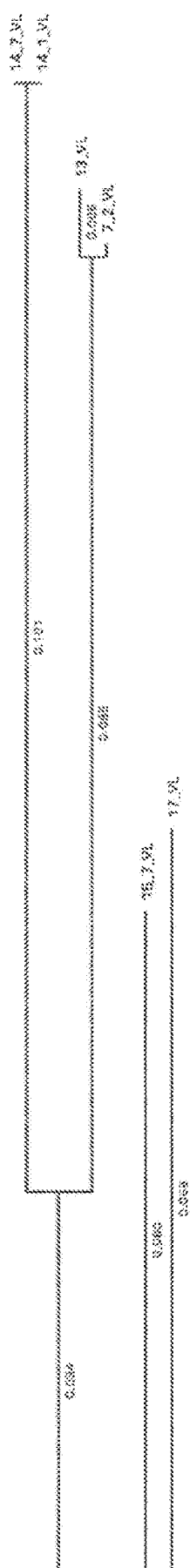


Figura 18A



**Figura 18B**

Tabla 1. Tabla de CDR (Kabat)

Secuencia	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
7_VL	QASESVYNSDWLA	11	AASLAS	12	AGYKSSSTDGIA	13
13_VL	QASESVYNSDWLA	11	AASLAS	12	AGYKSSSTDGIA	13
14-1_VL	QASQSVYNNNDYLS	29	YASLAS	30	AGVKGYSDNDNG	31
14-7_VL	QASQSVYNNNDYLS	29	YASLAS	30	AGVKGYSDNDNG	31
15_VL	QSSQSVYNNKNLA	47	STSTLDS	48	LGSYDCSSADCNA	49
17_VL	QSSQSVYANTYLS	59	SASSLAS	60	LGRYSCGLADCAA	61
7_VH	NNGIC	62	CLYVGSSDTTYASWAK	63	NLGL	7
13_VH	NNGIC	62	CLYVGSSDTTYASWAK	63	NLGL	7
14-1_VH	INYYMC	64	CIYTGDDDDTFYASWAK	65	GLYSGSINNLL	25
14-7_VH	INYYMC	64	CIYTGDDDDTFYASWAK	65	GLYSGSINNLL	25
15_VH	SNYYMC	66	CIFLGSSGNTVYANWAK	67	DYVNGYDYFNL	43
17_VH	DSWYLC	68	CIYTGDDDDTYATWAK	69	GAQFYL	55

Figura 19

Tabla 2. Tabla de CDR (Chothia)

Secuencia	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO.
7_VL	QASESVYNSDWLA	11	AASTLAS	12	AGYKSSSTDGIA	13
13_VL	QASESVYNSDWLA	11	AASTLAS	12	AGYKSSSTDGIA	13
14-1_VL	QASQSVYNNDYLS	29	YASTLAS	30	AGVKGYSNDNNG	31
14-7_VL	QASQSVYNNDYLS	29	YASTLAS	30	AGVKGYSNDNNG	31
15_VL	QSSQSVYNNKNLA	47	STSTLDS	48	LGSYDCSSADCNA	49
17_VL	QSSQSVYANTYLS	59	SASSLAS	60	LGRYSCGLADCAA	61
7_VH	GFSFSNN	5	YVGSSD	6	NLGL	7
13_VH	GFSFSNN	5	YVGSSD	6	NLGL	7
14-1_VH	GFDIFSINY	23	YTGDD	24	GLYSGSINN	25
14-7_VH	GFDIFSINY	23	YTGDD	24	GLYSGSINN	25
15_VH	GFSFTSINY	41	FLGSSG	42	DYVNGYDYFNL	43
17_VH	GFSFSDSW	53	YTGDG	54	GAQFYL	55

Figura 20

Tabla 3. Tabla de CDR (IMGT)

Secuencia	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
7_VL	QASESVYNSDWLA	11	AASTLAS	12	AGYKSSSTDGIA	13
13_VL	QASESVYNSDWLA	11	AASTLAS	12	AGYKSSSTDGIA	13
14-1_VL	QASQSVYNNDYLS	29	YASTLAS	30	AGVKGYSDNNG	31
14-7_VL	QASQSVYNNDYLS	29	YASTLAS	30	AGVKGYSDNNG	31
15_VL	QSSQSVYNNKLA	47	STSTLDS	48	LGSYDCSSADCNA	49
17_VL	QSSQSVYANTYLS	59	SASSLAS	60	LGRYSCGLADCAA	61
7_VH	GFSFSNNGIC	70	CLYVGSSDITTYASWAK	63	NLGL	7
13_VH	GFSFSNNGIC	70	CLYVGSSDITTYASWAK	63	NLGL	7
14-1_VH	GDFSINYYMC	71	CIYTGDDDTFYASWAK	65	GLYSGSINN	25
14-7_VH	GDFSINYYMC	71	CIYTGDDDTFYASWAK	65	GLYSGSINN	25
15_VH	GFSFTSNYYMC	72	CIYTGSSGNTVYANWAK	67	DYVNGYDYFNL	43
17_VH	GFSFSDSWYLC	73	CIYTGDDTYATWAK	69	GAQFYL	55

Figura 21

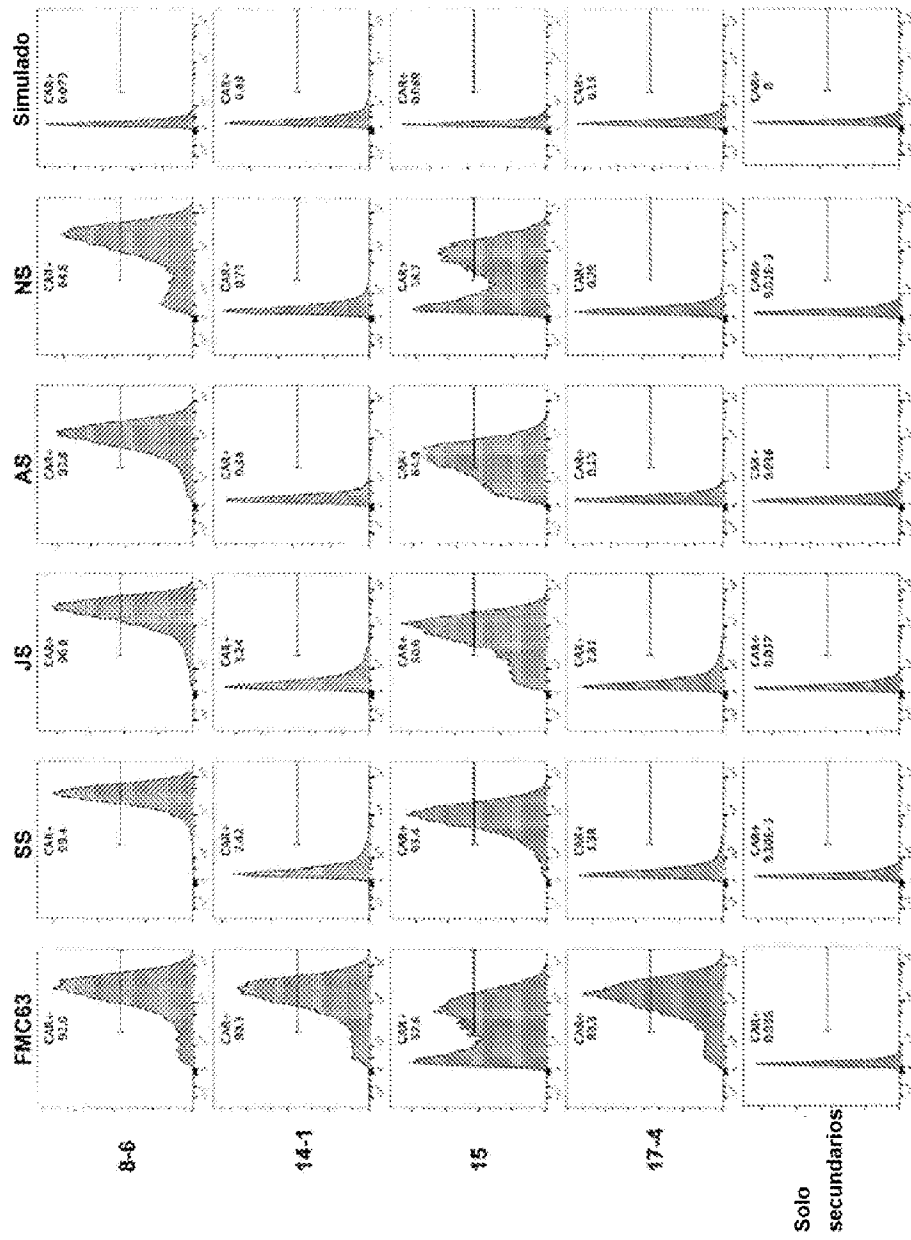


Figura 22