

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 004 039**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2017 PCT/US2017/044560**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18023100**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2017 E 17754531 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3491024**

54 Título: **Anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos anti-CD19**

30 Prioridad:

29.07.2016 US 201662369008 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2025

73 Titular/es:

**JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
400 Dexter Avenue North, Suite 1200
Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**HAUSKINS, COLLIN;
HEIPEL, MARK, D.;
SUTHERLAND, CLAIRE, L.;
SATHALIYA, TAHER y
SMITH, JEFF**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 3 004 039 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

Anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos anti-CD19

5 Campo

La presente divulgación se refiere en algunos aspectos a anticuerpos antiidiotipo que reconocen específicamente fracciones de anticuerpos anti-CD19, en particular, fracciones de anticuerpos anti-CD19 presentes en receptores recombinantes, incluidos los receptores de antígenos quiméricos (CAR). La divulgación se refiere además a usos de anticuerpos antiidiotipo para identificar o seleccionar específicamente células que expresan dichos receptores recombinantes, tales como linfocitos T CAR anti-CD19. La divulgación se refiere además a usos de anticuerpos antiidiotipo para activar específicamente dichas células.

15 Antecedentes

Existen métodos disponibles para la terapia celular adoptiva que utilizan células modificadas genéticamente que expresan receptores recombinantes, tales como el receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene dominios de unión al antígeno de anticuerpos extracelulares. Se dispone de diversas estrategias para evaluar la actividad de dichas células tanto *in vitro* como *in vivo* en un sujeto. Se necesitan métodos mejorados para evaluar específicamente la actividad de las células que expresan CAR. Se proporcionan reactivos, composiciones y artículos manufacturados que satisfacen tales necesidades.

Bipulendu Jena *et al.*, describen un anticuerpo monoclonal específico del receptor de antígeno quimérico (CAR) para detectar linfocitos T específicos de CD19 en ensayos clínicos.

El documento WO2014/190273A1 describe anticuerpos monoclonales dirigidos al receptor de antígeno quimérico.

Sumario

La presente invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 89 o 90, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 91, 92 o 93 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94; y
una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97, en donde:

(i) el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un anticuerpo diana o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada (VH) establecida en la SEQ ID NO: 30 y la secuencia de la región variable de cadena ligera (VL) establecida en la SEQ ID NO: 31; y
(ii) el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo agonista de un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno.

La presente invención también proporciona un conjugado, que comprende el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno de la presente invención y una molécula o fracción heteróloga, opcionalmente, en donde la molécula o fracción heteróloga es:

i) un marcador, opcionalmente en donde el marcador se selecciona entre un colorante fluorescente, una proteína fluorescente, un radioisótopo, un cromóforo, un ion metálico, una partícula de oro, una partícula de plata, una partícula magnética, un polipéptido, una enzima, una estreptavidina, una biotina, un compuesto luminiscente o un oligonucleótido; o
ii) una proteína, péptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que opcionalmente es o comprende una toxina o un Strep-Tag.

La presente invención también proporciona una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

La presente invención también proporciona un vector, que comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico de la presente invención.

La presente invención también proporciona una célula, que comprende el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión

a antígeno del mismo de la presente invención o la molécula de ácido nucleico de la presente invención.

La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende expresar la cadena pesada y ligera codificadas por la molécula de ácido nucleico de la presente invención o el vector de la presente invención en una célula hospedadora adecuada y recuperar o aislar el anticuerpo.

La invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, conjugado de la presente invención o la célula de la presente invención, que comprende opcionalmente además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un método para detectar un anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) poner en contacto una composición que comprende un anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo con el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o el conjugado de la presente invención que se une específicamente al anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada (VH) establecida en la SEQ ID NO: 30 y la secuencia de la región variable de cadena ligera (VL) establecida en la SEQ ID NO: 31; y
- (b) detectar el anticuerpo antiidiotipo unido al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno,

opcionalmente en donde el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno se expresa en la superficie de una célula, en donde la célula expresa en su superficie un CAR que comprende el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno y la detección en (b) comprende detectar células unidas con el anticuerpo antiidiotipo.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* de estimulación celular, que comprende incubar una composición de entrada que comprende células que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo con el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o el conjugado de la presente invención que se une específicamente al anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno del mismo, generando de esta manera una composición de salida que comprende células estimuladas, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada (VH) establecida en la SEQ ID NO: 30 y la secuencia de la región variable de cadena ligera (VL) establecida en la SEQ ID NO: 31.

En el presente documento se proporcionan agentes que se unen específicamente a los anticuerpos, incluidos fragmentos de anticuerpos tales como scFv, y moléculas quiméricas que los contienen, tales como receptores de antígeno quiméricos. También se proporcionan composiciones y artículos de fabricación que contienen dichos agentes, incluidos aquellos que incluyen una superficie a la que está unido el agente, tal como una superficie sólida, por ejemplo, una placa o una cuenta. También entre las realizaciones proporcionadas en el presente documento se encuentran usos y métodos de uso de dichos agentes, composiciones y artículos, incluyendo para detección, uso, manipulación y/o estimulación de células o terapias que contienen o se sospecha que contienen el anticuerpo o la molécula quimérica, tal como en la detección, estimulación o uso de células que expresan CAR.

En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un anticuerpo diana que es o contiene una o más regiones variables del anticuerpo designado FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y se une específicamente a una molécula quimérica que contiene dicho fragmento de anticuerpo, en particular un CAR con un dominio de unión que contiene regiones variables de anticuerpos derivadas de FMC63, tal como en forma de un scFv. En algunas realizaciones, el agente, en particular, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno contiene una región variable de cadena ligera (VL) que contiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región VL establecida en la SEQ ID NO: 40; y/o una región variable de cadena pesada (VH) que contiene al menos un 90 % de identidad de secuencia (y/o al menos un 95 % o 99 % de identidad de secuencia, o un 100 % de identidad) con la secuencia de aminoácidos de la región VH establecida en la SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno contiene una región VL que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia (y/o al menos un 95 % o 99 % de identidad de secuencia, o un 100 % de identidad) con la secuencia de aminoácidos de la región VL establecida en la SEQ ID NO: 40; y/o una región VH que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia (y/o al menos un 95 % o 99 % de identidad de secuencia, o un 100 % de identidad) con la secuencia de aminoácidos de la región VH establecida en la SEQ ID NO: 36.

En la invención, la región determinante de la complementariedad 3 (CDR-H3) contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 94 y contiene una CDR-H3 contenida dentro de la secuencia VH establecida en la SEQ ID NO: 36; y la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 3 (CDR-L3) contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 97 y que contiene una CDR-L3 contenida dentro de la secuencia VL establecida en la SEQ ID NO: 40.

En la invención, la región VH contiene una CDR-H1 y una CDR-H2, respectivamente, que incluye las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-H1 y CDR-H2 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región VH establecida en la SEQ ID NO: 36; y/o la región VL contiene una CDR-L1 y una CDR-L2, respectivamente, que incluye las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-L1 y CDR-L2 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región VL establecida en la SEQ ID NO: 40.

En la invención, la región VH contiene una CDR-H1 establecida en las SEQ ID NO: 89 o 90, una CDR-H2 establecida en las SEQ ID NO: 91, 92 o 93 y una CDR-H3 establecida en la SEQ ID NO: 94; y la región VL contiene una CDR-L1 establecida en la SEQ ID NO: 95, una CDR-L2 establecida en la SEQ ID NO: 96 y una CDR-L3 establecida en la SEQ ID NO: 97.

En la invención, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo contiene una CDR-H1, una CDR-H2 y una CDR-H3, respectivamente, que contiene la secuencia de aminoácidos de las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región VH establecida en la SEQ ID NO: 36; y una CDR-L1, una CDR-L2 y una CDR-L3, respectivamente, incluyendo las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región VL establecida en la SEQ ID NO: 40.

En la invención, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR-H1 que incluye la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 89 o 90, una CDR-H2 que incluye la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 91, 92 o 93, y una CDR-H3 que incluye la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 94; y una CDR-L1 que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95, una CDR-L2 que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96 y una CDR-L3 que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97.

En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, la región VH del anticuerpo o fragmento contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y/o la región VL del anticuerpo o fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. En algunas realizaciones, la región VH del anticuerpo o fragmento incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y la región VL del anticuerpo o fragmento incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40.

En la invención, la región VH contiene una CDR-H1 establecida en las SEQ ID NO: 89 o 90, una CDR-H2 establecida en las SEQ ID NO: 91, 92 o 93 y una CDR-H3 establecida en la SEQ ID NO: 94; y la región VL contiene una CDR-L1 establecida en la SEQ ID NO: 95, una CDR-L2 establecida en la SEQ ID NO: 96 y una CDR-L3 establecida en la SEQ ID NO: 97.

En la invención, la región VH contiene una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que incluye las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región VH establecida en la SEQ ID NO: 36; y la región VL contiene una CDR-L1, una CDR-L2 y una CDR-L3, respectivamente, incluyendo las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región VL establecida en la SEQ ID NO: 40.

En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, la región VH del anticuerpo o fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y/o la región VL del anticuerpo o fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40.

En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno es un fragmento de cadena única. En algunos aspectos, el fragmento contiene regiones variables de anticuerpo unidas por un enlazador flexible. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el fragmento contiene un scFv.

En la invención, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno contiene una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31; y opcionalmente es un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 34.

En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente al mismo epítipo o a un epítipo superpuesto de un anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno del mismo que el epítipo unido específicamente por el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno está dentro o incluido en el dominio de unión al antígeno de la porción extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR); y/o el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente al anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno contenido dentro o incluido en el dominio de unión al antígeno de la porción extracelular de un CAR. En algunas realizaciones, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno es un scFv y el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo en el scFv del CAR.

- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo o fragmento se une específicamente a un fragmento variable de cadena única (scFv) derivado del anticuerpo FMC63 comprendido en la porción extracelular de un receptor de antígeno quimérico, en donde el scFv derivado del anticuerpo FMC63 contiene una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31; y opcionalmente contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 34.
- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo dentro o incluyendo toda o una porción de una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno.
- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el CAR contiene además un dominio transmembrana unido al dominio de unión al antígeno a través de un espaciador. En algunas realizaciones, el espaciador contiene una porción extracelular de CD28, que opcionalmente es CD28 humano. En algunos aspectos, la porción extracelular de CD28 contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 27. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28, que opcionalmente es CD28 humano. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo o fragmento no se une a un epítipo en el dominio espaciador del CAR.
- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo o fragmento no se une o no se une específicamente a CD28 o una porción del mismo, que opcionalmente es CD28 humano, que opcionalmente contiene una porción extracelular de CD28, que opcionalmente contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 27. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo o fragmento no se une a un epítipo en un dominio Fc, que opcionalmente es un dominio Fc de IgG1 humana.
- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CD19 humano. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento no reacciona de forma cruzada con otro anticuerpo anti-CD19, que opcionalmente está contenido en el dominio de unión al antígeno extracelular de otro CAR. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento no reacciona de forma cruzada con otro CAR.
- En la invención, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento es un anticuerpo agonista de un CAR que contiene el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno.
- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es humanizado. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es recombinante. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es monoclonal.
- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos aspectos, el fragmento de unión a antígeno se selecciona entre fragmentos de unión a antígeno del fragmento (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, un fragmento variable de cadena única (scFv) o un anticuerpo de dominio único (sdAb).
- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo contiene al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina contiene una región Fc o una porción del Fc que contiene los dominios CH2 y CH3. En algunos aspectos, la región constante se obtiene de IgG humana. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo intacto o un anticuerpo de longitud completa.
- En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, se proporciona un conjugado que contiene el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente y una molécula o fracción heteróloga. En algunas realizaciones, la molécula o fracción heteróloga es un marcador. En algunos aspectos, el marcador se selecciona entre un colorante fluorescente, una proteína fluorescente, un radioisótopo, un cromóforo, un ion metálico, una partícula de oro, una partícula de plata, una partícula magnética, un polipéptido, una enzima, una estreptavidina, una biotina, un compuesto luminiscente o un oligonucleótido. En algunos casos, la molécula o fracción heteróloga es una proteína, péptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que opcionalmente es o contiene una toxina, Strep-Tag.
- En algunas realizaciones, se proporciona una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.
- En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico contiene una secuencia de nucleótidos que codifica (i) la región variable de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 50, (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 50; o (iii)

una secuencia degenerada de (i) o (ii); y/o una secuencia de nucleótidos que codifica (iv) la región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 54; (v) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 54; o (vi) una secuencia degenerada de (iv) o (v). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico contiene una secuencia de nucleótidos que codifica (i) la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 52; (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 52; o (iii) una secuencia degenerada de (i) o (ii); y/o una secuencia de nucleótidos que codifica (iv) la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 56; (v) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 56; o (vi) una secuencia degenerada de (iv) o (v). En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera contiene una secuencia señal.

En el presente documento se proporciona un vector que contiene la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento. También se proporciona en el presente documento una célula que contiene el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

Se proporciona en el presente documento un método para producir un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo la expresión de la cadena pesada y/o ligera codificada por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento o el vector de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una célula hospedadora adecuada y la recuperación o aislamiento del anticuerpo. En algunas realizaciones, el método para producir un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno incluye cultivar la célula de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en condiciones en las que se expresa la cadena pesada y/o la cadena ligera y recuperar o aislar el anticuerpo. En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo producido mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que contiene el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento o la célula de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, la composición contiene además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, se proporciona un kit que contiene uno o más del anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, y, opcionalmente, instrucciones de uso. En algunos casos, el kit contiene además un reactivo o soporte para inmovilizar el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo o conjugado, en donde dicho reactivo o soporte es una cuenta, una columna, un micropocillo, una barra, un filtro, una tira o un reactivo de muteína de estreptavidina oligomérica soluble.

También se proporcionan métodos de detección utilizando cualquiera de los agentes proporcionados, tales como los anticuerpos antiidiotipo. En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar un anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un CAR que contiene el mismo, incluyendo (a) poner en contacto una composición que contiene un anticuerpo diana con regiones variables derivadas de un anticuerpo FMC63 o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, con el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención; y (b) detectar el anticuerpo antiidiotipo unido al anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno y/o detectar la presencia o ausencia del anticuerpo o agente diana.

En algunas realizaciones, el método incluye (a) poner en contacto una composición que contiene o se sospecha que contiene un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno con el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las realizaciones descritas o el conjugado de cualquiera de las realizaciones descritas que se une específicamente a un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y (b) detectar el anticuerpo antiidiotipo unido al anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno y/o detectar la presencia o ausencia del anticuerpo o agente diana.

En algunos aspectos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno está unido a una célula o se expresa en la superficie de una célula y la detección en (b) incluye la detección de células unidas con el anticuerpo antiidiotipo. En algunas realizaciones, la célula expresa en su superficie un CAR que contiene el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno diana.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados implican detectar un CAR que contiene un anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las realizaciones, tal como un CAR que contiene dominios variables derivados de FMC63. En algunas realizaciones, el método incluye (a) poner en contacto una célula que

expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo con el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las realizaciones descritas o el conjugado de una cualquiera de las realizaciones descritas que se une específicamente a un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y (b) detectar células unidas con el anticuerpo antiidiotipo. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado directa o indirectamente para su detección.

En algunas de las divulgaciones, se proporciona un método para seleccionar células de una población celular, que incluye (a) poner en contacto una población de células que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo diana o una célula unida a un anticuerpo diana con el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las realizaciones descritas o conjugado de una cualquiera de las realizaciones descritas que se une específicamente a un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo diana es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y (b) seleccionar células unidas con el anticuerpo antiidiotipo.

En algunos casos, las células unidas con el anticuerpo antiidiotipo se seleccionan mediante separación basada en afinidad. En algunos aspectos, la separación basada en afinidad es una separación basada en inmunoafinidad. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, la separación basada en afinidad se realiza mediante citometría de flujo. En algunas realizaciones, la separación basada en afinidad se realiza mediante clasificación celular activada magnéticamente. En algunos aspectos, la separación basada en afinidad contiene cromatografía de afinidad. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo está unido o inmovilizado reversiblemente a un soporte o una fase estacionaria.

También entre los métodos proporcionados se encuentran métodos para estimular células utilizando los agentes, tales como estimular células que contienen una molécula tal como un CAR que es o contiene el anticuerpo diana reconocido por el anticuerpo antiidiotipo. En algunas realizaciones, el método incluye incubar una composición de entrada que contiene células que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo con el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las realizaciones descritas o el conjugado de una cualquiera de las realizaciones descritas que se une específicamente a un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, generando de esta manera una composición de salida que contiene células estimuladas.

En algunas realizaciones, los métodos dan lugar a proliferación, activación, estimulación, liberación de citocinas u otro resultado funcional tal como regulación por aumento de un marcador de activación o liberación o producción de citocinas, de células que expresan el receptor quimérico tal como el CAR reconocido por el anticuerpo anti-Id. En algunos aspectos, dicha proliferación u otra respuesta o lectura funcional se induce en dichas células hasta un grado similar o mayor que el inducido por la incubación de las células con un agente y/o condiciones que estimulan la proliferación de linfocitos T, tal como cuentas anti-CD3/CD28 y/o anti-CD3 reticulado. En algunos aspectos, los métodos no implican la reticulación del anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos de cualquiera de las realizaciones, los agentes antiidiotipo son capaces de inducir la proliferación especificada o el resultado funcional o el grado del mismo, sin reticulación del anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos, los agentes antiidiotipo del presente documento son ventajosos por su capacidad para estimular o provocar un resultado funcional particular de los linfocitos T u otras células inmunitarias que expresan el receptor diana, sin necesidad de reticular el anticuerpo anti-Id o utilizar un agente secundario. En algunos aspectos, el resultado se consigue con la forma soluble o unida a placa del anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos, el resultado se consigue con el anticuerpo antiidiotipo acoplado a una cuenta.

En algunos casos de la divulgación, se proporciona un método para producir una composición celular, incluyendo (a) introducir en las células una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), generando así una composición de entrada; e (b) incubar la composición de entrada con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el receptor de antígeno del CAR, produciendo de esta manera la composición celular.

En algunos aspectos, el CAR contiene un anticuerpo diana que se une específicamente a CD19. En algunos casos, el anticuerpo diana es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 de una cualquiera de las realizaciones descritas que se une específicamente a un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos de estos casos, la introducción en (a) incluye la introducción de la molécula de ácido nucleico en las células mediante transducción viral, transposición, electroporación o transfección química. En algunos casos, la introducción en (a) incluye la introducción de la molécula de ácido nucleico en las células mediante transducción con un vector retroviral que contiene la molécula de ácido nucleico, en donde, opcionalmente, el vector vírico es un vector retroviro o un vector lentivírico. En algunos aspectos, la introducción en (a) incluye la introducción de la molécula de ácido

nucleico en las células mediante transposición con un transposón que contiene la molécula de ácido nucleico. En algunos casos, la introducción en (a) incluye la introducción de la molécula de ácido nucleico en las células mediante electroporación o transfección de un vector que contiene la molécula de ácido nucleico.

5 En algunos de estos casos, el método incluye además una etapa de activación de las células antes de la etapa (a). En algunos aspectos, la etapa de activar las células incluye poner en contacto las células con un agonista de CD3 y opcionalmente un agonista de CD28. En algunos casos, la etapa de activación de las células incluye poner en contacto las células con un reactivo que contiene anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28.

10 En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, la incubación se realiza en condiciones en las que el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al CAR, induciendo o modulando de este modo una señal en una o más células en la composición de entrada. En cualquiera de dichas realizaciones, las células contienen linfocitos T. En algunos casos, los linfocitos T contienen linfocitos T CD4+ y/o CD8+.

15 En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está inmovilizado en un soporte sólido, que opcionalmente contiene o está conjugado con un reactivo que contiene una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse reversiblemente al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está inmovilizado en un reactivo soluble, que opcionalmente es o contiene una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse reversiblemente al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el reactivo contiene una proteína de estreptavidina.

20 En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, la incubación dura al menos o aproximadamente al menos 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36, 48 horas, 72 horas o 96 horas.

25 En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, la composición de entrada contiene menos de o menos de aproximadamente el 60 %, menos de o menos de aproximadamente el 50 %, menos de o menos de aproximadamente el 40 %, menos de o menos de aproximadamente el 30 %, menos de o menos de aproximadamente el 20 % o menos de o menos de aproximadamente el 10 % de células que expresan CAR como porcentaje del total de células en la composición.

30 En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, el número de células que expresan CAR en la composición de salida aumenta en más de 1,2 veces, 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 10 veces o más en comparación con el número de células que expresan CAR en la composición de entrada; y/o el porcentaje de expresión de CAR en la composición de salida en comparación con el total de células en la composición aumenta en más del 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más.

35 En algunas de cualquiera de dichas realizaciones, antes de la introducción y/o incubación, las células no se seleccionan ni se enriquecen con células que expresan CAR.

40 En la invención, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno contiene una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

45 En algunos casos de la divulgación, se proporciona un método para purificar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo (a) poner en contacto una composición que contiene un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo con el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las realizaciones descritas o el conjugado de una cualquiera de las realizaciones descritas que se une específicamente a un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y (b) aislar complejos que comprenden el anticuerpo antiidiotipo.

50 En algunos casos, los complejos que contienen el anticuerpo antiidiotipo se aíslan mediante separación basada en afinidad. En algunos aspectos, la separación basada en afinidad es una separación basada en inmunoafinidad. En algunos casos, la separación basada en afinidad es una separación basada en magnetismo. En algunos casos, la separación basada en afinidad incluye cromatografía de afinidad.

55 En algunos casos de la divulgación, se proporciona un método para identificar un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno que incluye (a) introducir en un sujeto un reactivo de inmunización soluble que contiene un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo diana fusionado a una fracción solubilizante; y (b) identificar un anticuerpo del sujeto que se une específicamente al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno del mismo.

60 En algunos de estos casos, el fragmento de unión a antígeno contiene la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento de cadena única. En algunos aspectos, el fragmento de unión a antígeno es un scFv. En algunos de estos casos, el fragmento de unión a antígeno está dentro o incluido en el dominio de unión al antígeno de la porción extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR).

65

En algunos de estos casos, la fracción solubilizante es un dominio Fc o un fragmento del mismo, que opcionalmente es un Fc de IgG1 humana. En algunos aspectos, la fracción solubilizante es un dominio Fc que carece de la región bisagra. En algunos casos, la fracción solubilizante comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 32.

En algunos de estos casos, la identificación del anticuerpo incluye (i) aislar linfocitos B del bazo del sujeto y fusionarlas con linfocitos B inmortalizadas para generar hibridomas; (ii) examinar los hibridomas para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno del mismo o a un receptor de antígeno quimérico que contiene el fragmento de unión a antígeno; y (iii) secuenciar un anticuerpo de un hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente, identificando así el anticuerpo antiidiotipo.

En algunos de estos casos, el anticuerpo diana se une a CD19. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo diana deriva del anticuerpo FMC63, opcionalmente en donde el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo diana contiene una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo diana es un fragmento variable de cadena única (scFv) derivado del anticuerpo FMC63, opcionalmente en donde el scFv contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 34.

En algunos casos de la divulgación, se proporciona un método para deplecionar células, que comprende administrar, a un sujeto, una composición que comprende el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento o un conjugado de una cualquiera de las realizaciones descritas que se une específicamente a un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde al sujeto se le ha administrado una célula que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, la depleción se produce a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

Se describe en el presente documento un método para determinar la presencia o ausencia de una molécula que se une a un receptor de antígeno quimérico (CAR), incluyendo el método (a) poner en contacto un reactivo de unión con una muestra de un sujeto al que se le ha administrado una terapia celular que contiene células diseñadas con un CAR que contiene un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en condiciones para formar un complejo que comprende el reactivo de unión y una molécula de la muestra que se une al reactivo de unión, en donde el reactivo de unión contiene el dominio extracelular del CAR o una porción del dominio extracelular que comprende el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno del mismo; y (b) detectar la presencia o ausencia del complejo. En algunos casos, el método incluye además la realización de las etapas (a) y (b) en una muestra de control positivo y, opcionalmente, determinar la presencia o ausencia de la molécula por comparación con el control positivo, en donde la muestra de control positivo contiene cualquiera de anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento o cualquiera de los conjugados descritos en el presente documento que se une específicamente al anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos de estos casos, la molécula que se une al reactivo de unión es o contiene un anticuerpo. En algunos casos, el reactivo de unión está marcado de forma detectable o es capaz de producir una señal detectable. En algunos casos, el reactivo de unión está unido a un soporte sólido o es soluble.

En algunos de estos casos, el complejo se detecta mediante un inmunoensayo. En algún ejemplo, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo quimioluminiscente, ensayo electroquimioluminiscente, biosensor basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, BIAcore), citometría de flujo o transferencia Western. En algunos casos, el inmunoensayo comprende el descubrimiento a escala meso. En algunos casos, el inmunoensayo es un ensayo de tipo sándwich o ensayo de puente.

En algunos de estos casos, el reactivo de unión es un primer reactivo de unión y detectar la presencia o ausencia del complejo incluye: (i) poner en contacto el complejo formado en la etapa (a) con un segundo reactivo de unión, en donde el segundo reactivo de unión (1) contiene el dominio extracelular del CAR o una porción del mismo que comprende el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno del mismo y (2) está marcado de forma detectable o es capaz de producir una señal detectable; y (ii) evaluar la presencia o ausencia de la señal detectable. En algunos aspectos, el primer reactivo de unión está unido a un soporte sólido, opcionalmente, en donde el primer reactivo de unión está unido, directa o indirectamente, a una biotina y/o unido a un soporte sólido a través de una estreptavidina; y/o el segundo reactivo de unión es soluble. En algunos casos, el dominio extracelular del CAR o porción del mismo del primer y segundo reactivo de unión es el mismo.

En algunos de estos casos, el marcador detectable es o contiene un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroluminiscente, un marcador colorimétrico, un marcador bioluminiscente o un radiomarcador; y/o la señal detectable es o contiene una señal fluorescente, señal quimioluminiscente, señal electroluminiscente, señal colorimétrica, una señal bioluminiscente o una señal radiactiva. En algunos de estos casos, el marcador detectable es o contiene un SULFO-TAG.

En algunos de estos casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo diana contiene la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana. En algunos de estos casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo diana es un fragmento de cadena única. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo diana es un scFv.

En algunos de estos casos, la muestra comprende sangre entera, suero o plasma.

Se proporciona en el presente documento un artículo de fabricación que contiene cualquiera de los anticuerpos antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento o cualquiera de los conjugados descritos en el presente documento e instrucciones para usar el anticuerpo antiidiotipo para detectar un anticuerpo FMC63 o fragmento de unión a antígeno del mismo o un receptor de antígeno quimérico que contiene el anticuerpo FMC63 o fragmento de unión a antígeno del mismo; para seleccionar o enriquecer, de una población de células, células diseñadas que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; para estimular una composición de entrada que comprende células que expresan un receptor de antígeno quimérico que contiene el anticuerpo FMC63 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En el presente documento se divulga un artículo de fabricación que contiene un reactivo de unión que incluye el dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, conteniendo dicho dominio extracelular o porción del mismo el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno del mismo; y un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento o cualquiera de los conjugados descritos en el presente documento. En algunos casos, el reactivo de unión es un primer reactivo de unión y el artículo fabricado incluye además un segundo reactivo de unión que contiene el dominio extracelular o una porción del mismo del CAR.

En algunos de estos casos, el dominio extracelular del CAR o porción del mismo del primer y segundo reactivo de unión es el mismo.

En algunos de estos casos, el artículo de fabricación incluye además instrucciones para usar el reactivo de unión, opcionalmente el primer y segundo reactivo de unión, para analizar una muestra para determinar la presencia o ausencia de una molécula que se une al reactivo de unión mediante un inmunoensayo, opcionalmente, en donde el inmunoensayo es un inmunoensayo de tipo puente o sándwich, opcionalmente, en donde la muestra proviene de un sujeto al que se le ha administrado una terapia celular que incluye células diseñadas con un CAR que contiene un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos casos, el reactivo de unión, opcionalmente el primer y/o segundo reactivo de unión, está marcado de forma detectable o es capaz de producir una señal detectable. En algunos casos, uno del primer y segundo reactivo de unión está unido a un soporte sólido o es capaz de unirse a un soporte sólido y el otro del primer y segundo reactivo de unión es un marcador detectable o es capaz de producir una señal detectable. En algunos casos, el artículo de fabricación incluye además un soporte sólido, opcionalmente, en donde el primer y el segundo reactivo de unión están unidos, directa o indirectamente, a biotina, y el soporte sólido comprende una superficie recubierta de estreptavidina.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de la citometría de flujo para evaluar la actividad funcional de un anticuerpo antiidiotipo específico de scFv derivado de SJ25C1 clon A-1 (anti-ID A-1) para estimular la fosforilación de Erk1/2 en células Jurkat diseñadas con un CAR derivado de SJ25C1. La activación con un anticuerpo anti-CD3 se incluyó como control positivo. Se incluyeron células no estimuladas o estimuladas con control de isotipo como controles negativos.

La figura 2A-B muestra los resultados de un ensayo para la proliferación de linfocitos T que expresan un CAR que contiene un dominio de unión derivado de SJ25C1 (FIG. 2A) o un dominio de unión derivado de FMC63 (FIG. 2B), según se evaluó mediante dilución de colorante utilizando citometría de flujo después de la estimulación con un anticuerpo anti-CD3 (OKT3), un anticuerpo anti-idiotipo anti-ID A-1 o anti-ID B-1. Las células sin estimular se incluyeron como control negativo.

La **figura 2C** muestra los resultados de un ensayo para la proliferación de linfocitos T transducidas simuladas y transducidas con CAR (marcadas con colorante), después del cultivo en presencia de un anticuerpo antiidiotipo unido a la placa que estimula el dominio de unión del CAR, evaluado mediante dilución de colorante mediante citometría de flujo.

La **figura 3** muestra resultados para una evaluación de la expresión de dos marcadores de activación de linfocitos T, CD69 y CD25, en linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan un CAR con regiones variables derivadas de SJ25C1 según evaluación por citometría de flujo después de la estimulación con anticuerpo anti-CD3 unido a placa (OKT3), anti-ID A-1 o anti-ID B-1.

La **figura 4** muestra resultados para una evaluación de la expresión de dos marcadores de activación de linfocitos T, CD69 y CD25, en linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan un CAR con un dominio de unión que tiene regiones variables derivadas de FMC63, según se evaluó mediante citometría de flujo después de la estimulación con

anticuerpo anti-CD3 unido a placa (OKT3), anti-ID A-1 o anti-ID B-1, o un anticuerpo antiidiotipo no objetivo de control negativo. Las células sin estimular se incluyeron como control negativo.

La **figura 5** muestra los resultados de un ELISA puente para detectar anticuerpos anti-CAR utilizando anticuerpos anti-ID B-1 y anti-ID B-2 que reconocen el dominio de unión de CAR, en un intervalo de concentraciones, como controles positivos.

La **figura 6** y **figura 7** muestran la expansión del número acumulado y de expansión linfocitos T EGFRt+/CD4+ o linfocitos T EGFRt+/CD8+, respectivamente, estimulados con la proporción indicada de perlas recubiertas con anticuerpo antiidiotipo (anti-ID B-1) o perlas recubiertas con anticuerpo control CD3/CD28 en presencia o ausencia de citocinas.

La **figura 8** muestra niveles de expresión de PD-1 de linfocitos T CD4+ para la tinción con el anticuerpo anti-EGFR y, por lo tanto, positivas para el marcador de transducción EGFRt, después de la estimulación con la proporción indicada de perlas recubiertas con anticuerpo antiidiotipo (anti-ID B-1) o perlas recubiertas con anticuerpo control CD3/CD28 en presencia o ausencia de citocinas, según se evaluó mediante citometría de flujo los días 3, 7, 10 y 14 de cultivo.

La **figura 9** muestra la viabilidad de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan un CAR derivado de FMC63, según se evaluó mediante citometría de flujo después de la estimulación con la proporción indicada de perlas recubiertas con anticuerpo antiidiotipo (anti-ID B-1) o perlas recubiertas con anticuerpo de control CD3/CD28 en presencia o ausencia de citocinas, según se evaluó mediante citometría de flujo los días 3, 7, 10 y 14 de cultivo.

La **figura 10A** muestra tinción de citocinas intracelulares para IL-2, TNFα e IFNγ de linfocitos T que expresan un CAR derivado de FMC63 después de la estimulación con perlas recubiertas de anticuerpo antiidiotipo específico scFv derivado de FMC63 (anti-ID B-1). Se muestran los resultados para linfocitos T CD8+ o negativos para el marcador de transducción sustituto EGFRt (EGFR+ o EGFRt-).

La **figura 10B** muestra tinción de citocinas intracelulares para IL-2, TNFα e IFNγ de linfocitos T que expresan un CAR derivado de FMC63 después de la estimulación con células K562-CD19 que expresan antígeno. Se muestran los resultados de linfocitos T CD8+ para el anticuerpo anti-EGFR como sustituto de la expresión de CAR.

La **figura 11** muestra el número de duplicaciones de población en un ensayo de estimulación en serie durante un período de cultivo de 14 días de linfocitos T que expresan un CAR derivado de scFv derivado de FMC63 después de la estimulación con la proporción indicada de perlas recubiertas con anticuerpo antiidiotipo (anti-ID B-1) o perlas recubiertas con anticuerpo de control anti-CD3/anti-CD28 en presencia o ausencia de citocinas. Se muestran los resultados para linfocitos T CD4+ para el marcador de transducción sustituto EGFRt (EGFRt+/CD4+) o linfocitos T CD8+ para EGFRt (EGFRt+/CD8+).

La **figura 12A-12C** muestran resultados después de la estimulación de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan un CAR derivado de FMC63, cultivado solo o como co-cultivo, con perlas recubiertas de anticuerpos antiidiotipo específicos de scFv derivados de FMC63 (anti-ID B-1). Se muestran los resultados de dos donantes diferentes. La **figura 12A** representa la expansión de las linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos que fueron positivos para el marcador de transducción sustituto EGFRt (EGFRt+/CD4+ o EGFRt+/CD8+). La **figura 12B** muestra la frecuencia de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos que fueron positivos para EGFRt (EGFRt+/CD4+ o EGFRt+/CD8+). La **figura 12C** muestra la viabilidad de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos.

La **figura 13A** y **13B** muestran los resultados de citometría de flujo para marcadores de superficie celular de linfocitos T los días 5, 7 y 9 de cultivo después de la estimulación de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan un CAR derivado de FMC63, cultivado solo o como co-cultivo, con perlas recubiertas de anticuerpos antiidiotipo específicos de scFv derivados de FMC63 (anti-ID B-1). La **figura 13A** muestra la expresión superficial de PD-1 en linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos que fueron positivos para el marcador de transducción sustituto EGFRt (EGFRt+/CD4+ o EGFRt+/CD8+). La **figura 13B** muestra la expresión superficial de CD25 en linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos que fueron positivos para el anticuerpo anti-EGFR como sustituto de la expresión de CAR (EGFRt+/CD4+ o EGFRt+/CD8+).

La **figura 14A** muestra niveles intracelulares de citocinas de TNFα, IFNγ e IL-2 evaluados mediante citometría de flujo de linfocitos T CD4+ o CD8+ presentes en una composición descongelada que contiene linfocitos T que expresan un CAR derivado de FMC63 que se había expandido en cultivo con células K562 que expresaban CD19 o con PMA/ionomicina. Se muestran los niveles de citocinas en las linfocitos T CD4+ y CD8+, solo o como co-cultivo, al descongelarse (d=0) o después de un cultivo adicional durante 9 días más en presencia de perlas conjugadas con anti-ID B-1.

La **figura 14B** muestra la frecuencia de células positivas para CD25 o Ki67 según se evaluó mediante citometría de flujo de linfocitos T CD4+ o CD8+ presentes en una composición descongelada que contiene linfocitos T que expresan un CAR derivado de FMC63 que se había expandido en cultivo con células K562 que expresaban CD19 o con PMA/ionomicina. Se muestran los niveles de los marcadores en linfocitos T CD4+ y CD8+, solo o como co-cultivo, al descongelarse (d=0) o después de un cultivo adicional durante 9 días más en presencia de perlas conjugadas con anti-ID B-1.

La **figura 15A** y **15B** muestra un gráfico que representa los resultados de la tinción de células con anticuerpos anti-EGFR o anticuerpos anti-idiotipo específicos de scFv derivados de FMC63 (anti-ID B-1 y anti-ID B-2). La **figura 15A** muestra un gráfico que representa la intensidad fluorescente media de las células que se tiñeron con diferentes concentraciones de anticuerpos. Las células incluían una mezcla de PBMC y células que expresaban CAR. La **figura 15B** muestra un gráfico que representa el porcentaje de células que expresan CAR en el anticuerpo antiidiotipo específico scFv derivado de FMC63 (anti-ID B-1) detectado en células que se tiñeron con diferentes concentraciones de anticuerpos. Las células incluían una mezcla de PBMC y células que expresaban CAR y PBMC solamente.

Descripción detallada

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para usar en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

En el presente documento se divulgan agentes tales como anticuerpos antiidiotipo y fragmentos de unión a antígeno (tales como fragmentos de cadena única, incluidos scFv) que reconocen específicamente fracciones de anticuerpos anti-CD19 (tales como fracciones de anticuerpos anti-CD19 presentes en receptores recombinantes, incluidos receptores de antígenos quiméricos). También se desvelan usos y métodos de uso de los mismos y composiciones y artículos de fabricación que incluyen dichos agentes, incluyendo para identificar específicamente, seleccionar y/o estimular y/o activar células que expresan o incluyen los anticuerpos o fragmentos diana, tales como linfocitos T CAR anti-CD19. En algunos casos, los anticuerpos desvelados se pueden utilizar para la identificación y/o selección específica de varios CAR anti-CD19, tales como CAR unidos o expresados en una superficie celular y también se pueden utilizar para activar específicamente células que expresan CAR diana, tales como los linfocitos T CAR. En algunos casos, se desvelan anticuerpos que son específicos del anticuerpo anti-CD19 denominado SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de anticuerpo derivado del mismo, incluyendo anticuerpos y CAR que contienen regiones variables derivadas de dichos anticuerpos, y/o un anticuerpo que contiene un idiotipo contenido en el mismo.

En algunos aspectos, los anticuerpos antiidiotipo desvelados ofrecen ventajas en comparación con los reactivos convencionales para detectar, identificar, manipular y/o afectar y/o diseñar células que expresan un CAR y en particular un CAR que contiene un dominio extracelular scFv de anticuerpo anti-CD19 o uno que contiene el idiotipo reconocido. En ciertos métodos disponibles, la detección de la presencia o ausencia o cantidad de CAR o de células que expresan CAR (y/o la estimulación o manipulación del CAR), en una muestra, se lleva a cabo evaluando la presencia o ausencia o cantidad de una molécula sustituta, tal como uno incluido en el constructo que codifica el CAR y que, por tanto, sirve como marcador indirecto o sustituto para su expresión. En ciertos métodos disponibles, la detección se lleva a cabo utilizando un reactivo de anticuerpo genérico y/o un reactivo que no es específico para el CAR particular evaluado, por ejemplo, en comparación con otros CAR que pueden tener dominios similares o idénticos además de la región de unión al antígeno; por ejemplo, dichos anticuerpos pueden incluir anticuerpos anti-especie que reconocen espaciadores u otros dominios de la especie de la que se derivó un dominio CAR, y/o anticuerpos que reconocen componentes particulares utilizados en regiones espaciadoras del objetivo y también otros receptores quiméricos. En ciertos métodos disponibles diseñados para detectar la presencia o ausencia de CAR, la detección se lleva a cabo utilizando un agente que reconoce una región constante CAR. En ciertos métodos disponibles, las células CAR se estimulan mediante el uso de reactivos generales, tales como agentes que reconocen anti-CD3/CD28. Ciertos métodos utilizan un ligando recombinante del CAR (por ejemplo, CD19-Fc). Estos métodos en ciertos contextos pueden no ser totalmente satisfactorios y/o presentar ciertas limitaciones. En algunos casos, ligandos de CAR, tal como el documento CD19, puede que no siempre sea del todo eficaz, por ejemplo, para su uso en paneles de citometría de flujo complejos. Se necesitan métodos y agentes mejorados, incluidos aquellos que proporcionan una mejor sensibilidad y/o selectividad. En el presente documento se divulgan casos que satisfacen tales necesidades.

Los anticuerpos antiidiotipo divulgados y fragmentos de unión al antígeno descritos superan en algunos casos los desafíos de la baja afinidad de unión asociada con los ligandos de anticuerpos diana y la unión no específica asociada con los reactivos de anticuerpos dirigidos a las regiones constantes de anticuerpos diana, proporcionando un reactivo con alta afinidad y especificidad para su anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, los anticuerpos divulgados presentan una mayor especificidad y afinidad de unión por sus anticuerpos diana o fragmentos de unión al antígeno, tal como el anticuerpo anti-CD19 denominado SJ25C1 o FMC63, en comparación con CD19-Fc y otros reactivos actualmente disponibles para detectar o identificar el CAR.

Adicionalmente, en determinados casos, anticuerpos antiidiotipo y fragmentos de unión a antígeno que pueden seleccionarse como agonistas o antagonistas de receptores quiméricos que comprenden sus anticuerpos diana o fragmentos de unión a antígeno, que permiten la detección selectiva, aislamiento, ablación y/o depleción (por ejemplo, eliminación mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, CCDA), y/o estimulación o activación de células con dichos receptores quiméricos unidos o expresados en su superficie. En el presente documento se divulgan agonistas de anticuerpos antiidiotipo que exhiben actividad para estimular, tal como activar, un CAR que contiene un dominio de unión extracelular derivado del anticuerpo anti-CD19 denominado SJ25C1 o FMC63. En algunos aspectos, dichos anticuerpos se pueden utilizar en métodos de estimulación y expansión de células específicas que expresan CAR, incluso en procesos para generar y preparar las células que expresan CAR.

En el presente documento también se divulgan ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos antiidiotipo divulgados y fragmentos y células, tales como células recombinantes, que expresan y para la producción de estos anticuerpos antiidiotipo y fragmentos. También se divulgan métodos para elaborar y utilizar los anticuerpos antiidiotipo y fragmentos, así como células que expresan o contienen los anticuerpos antiidiotipo y fragmentos.

Los títulos de sección utilizados en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no han de interpretarse como una limitación de la materia objeto descrita.

I. ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

Se divulgan en algunos aspectos moléculas de unión, tales como anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno ("anti-ID") que reconocen específicamente una fracción de anticuerpo anti-CD19 diana. En algunos casos, los anticuerpos divulgados reconocen un anticuerpo anti-CD 19 diana que es SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo o es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de SJ25C1. En algunos casos, los anticuerpos divulgados reconocen un anticuerpo anti-CD19 diana que es FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de FMC63.

SJ25C1 es un anticuerpo de IgG1 monoclonal de ratón generado contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). El anticuerpo SJ25C1 comprende las secuencias de CDRH1, H2 y H3 expuestas en las SEQ ID NO: 114-116, respectivamente, y secuencias CDRL1, L2 y L3 establecidas en las SEQ ID NO: 117-119, respectivamente. El anticuerpo SJ25C1 comprende la región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y la región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

En algunos casos, el anticuerpo diana es SJ25C1 o un anticuerpo derivado de SJ25C1. En algunos casos, el anticuerpo derivado de SJ25C1 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la V_H y/o V_L de SJ25C1, el idiotipo de SJ25C1, el paratopo de SJ25C1, o una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de SJ25C1. En algunos casos, el anticuerpo diana que es SJ25C1 o un anticuerpo derivado de SJ25C1 es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprende V_H de SJ25C1 establecido en la SEQ ID NO: 23, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 23 y/o la V_L de SJ25C1 establecida en la SEQ ID NO: 24, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana que es SJ25C1 o un anticuerpo derivado de SJ25C1 es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprende V_H de SJ25C1 establecido en la SEQ ID NO: 23, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 23 y la V_L de SJ25C1 establecida en la SEQ ID NO: 24, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la V_H y V_L de SJ25C1 establecida en la SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente. En algunos casos, la variante tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 23 y/o la SEQ ID NO: 24.

En algunos casos, el anticuerpo diana que es SJ25C1 o un anticuerpo derivado de SJ25C1 es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprende una o más CDR de cadena pesada (CDR-H) de SJ25C1 V_H establecida en la SEQ ID NO: 23, tal como se establece en las SEQ ID NOS: 114-116 y/o una o más CDR de cadena ligera (CDR-L) de SJ25C1 V_L establecida en la SEQ ID NO: 24, tal como se establece en las SEQ ID NOS: 117-119. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende CDR-H3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en la SEQ ID NO: 116) y/o CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en la SEQ ID NO: 119). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende CDR-H3 y CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en las SEQ ID NO: 116 y 119, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo diana que es SJ25C1 o un anticuerpo derivado de SJ25C1 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una o más de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en las SEQ ID NO: 114, 115, 116, respectivamente) y/o una o más de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en las SEQ ID NO: 117, 118, 119, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo diana que es SJ25C1 o un anticuerpo derivado de SJ25C1 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en las SEQ ID NO: 114, 115, 116, respectivamente) y/o CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en las SEQ ID NO: 117, 118, 119, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo diana que es SJ25C1 o un anticuerpo derivado de SJ25C1 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en las SEQ ID NO: 114, 115, 116, respectivamente) y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, establecida en las SEQ ID NO: 117, 118, 119, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un fragmento de unión a antígeno, tal como un fragmento de unión a antígeno (Fab), un F(ab')₂, un Fab', una variable de fragmento (Fv) o un Fv de cadena única (scFv). Véase por ejemplo Bejcek, B. E., *et al.* (1995). *Cancer research*. 55(11): 2346-2351.

FMC63 es un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón generado contra células JVM3 que expresan CD19 de origen humano (Nicholson *et al.* (1997). *Molecular Immunology*. 34(16-17):1157-1165). El anticuerpo FMC63 comprende las secuencias de CDRH1, H2 y H3 expuestas en las SEQ ID NO: 120-122, respectivamente, y CDRL1, L2 y L3 establecidas en las SEQ ID NO: 123-125, respectivamente. El anticuerpo FMC63 comprende la región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y la región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, el anticuerpo diana es FMC63 o un anticuerpo derivado de FMC63. En algunos casos, el anticuerpo derivado de FMC63, es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende V_H y/o V_L de FMC63, el idiotipo de FMC63, el paratopo de FMC63, o una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de FMC63. En algunos casos, el anticuerpo diana que es FMC63 o un anticuerpo derivado de FMC63 es un anticuerpo o un

fragmento de unión a antígeno que comprende V_H de FMC63 establecido en la SEQ ID NO: 30, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 30 y la V_L de FMC63 establecida en la SEQ ID NO: 31, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, el anticuerpo diana que es FMC63 o un anticuerpo derivado de FMC63 es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno comprende V_H de FMC63 establecido en la SEQ ID NO: 30, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 30 y la V_L de FMC63 establecida en la SEQ ID NO: 31, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la V_H y V_L de FMC63 establecida en la SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31, respectivamente. En algunos casos, la variante tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 30 y/o la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, el anticuerpo diana que es FMC63 o un anticuerpo derivado de FMC63 es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno comprende una o más CDR de cadena pesada (CDR-H) de FMC63 V_H establecida en la SEQ ID NO: 30, tal como se establece en las SEQ ID NOS: 120-122 y/o una o más CDR de cadena ligera (CDR-L) de FMC63 V_L establecida en la SEQ ID NO: 31, tal como se establece en las SEQ ID NOS: 123-125. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende CDR-H3 de FMC63 (por ejemplo, establecida en la SEQ ID NO: 122) y/o CDR-L3 de FMC63 (por ejemplo, establecida en la SEQ ID NO: 125). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende CDR-H3 (por ejemplo, establecida en la SEQ ID NO: 122) y CDR-L3 de FMC63 (por ejemplo, establecida en la SEQ ID NO: 125). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una o más de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de FMC63 (establecida en las SEQ ID NO: 120, 121, 122, respectivamente) y/o una o más de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de FMC63 (establecida en las SEQ ID NO: 123, 124, 125, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de FMC63 (establecida en las SEQ ID NO: 120, 121, 122, respectivamente) y/o CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de FMC63 (establecida en las SEQ ID NO: 123, 124, 125, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de FMC63 (establecida en las SEQ ID NO: 120, 121, 122, respectivamente) y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de FMC63 (establecida en las SEQ ID NO: 123, 124, 125, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un fragmento de unión a antígeno, tal como un fragmento de unión a antígeno (Fab), un $F(ab')_2$, un Fab', una variable de fragmento (Fv) o un Fv de cadena única (scFv).

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo divulgados incluyen anticuerpos que se unen específicamente a un dominio variable (Fv), tal como un Fv de cadena única (scFv), derivado de SJ25C1 o FMC63. En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo se unen específicamente a un epítipo o región particular de un Fv, generalmente un epítipo o región que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad. En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo se unen específicamente a un epítipo o región superpuesta a un paratopo Fv.

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo divulgados incluyen aquellos que se unen específicamente a una fracción anti-CD 19 derivada de SJ25C1 o FMC63 que está contenida como parte del dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR) diana. En algunos casos, el CAR diana contiene una porción de unión al antígeno que contiene la molécula de anticuerpo SJ25C1 o FMC63 o un fragmento o porción de unión al antígeno del anticuerpo SJ25C1 o FMC63. En algunos casos, el CAR diana incluye un dominio de unión al antígeno que es un scFv derivado de las cadenas V_H y V_L del anticuerpo SJ25C1 o FMC63. En algunos casos, se divulga un anticuerpo antiidiotipo que se une específicamente a un CAR anti-CD 19 que contiene un scFv derivado del anticuerpo SJ25C1 o FMC63. A continuación se describen con más detalle características ilustrativas de los CAR.

En el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión a antígeno), incluyendo fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, incluyendo fragmentos variables monocatenarios (scFv) y anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas de inmunoglobulinas modificadas por ingeniería genética y/o de otro modo, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, multispecíficos, por ejemplo, biespecíficos, anticuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique otra cosa, debe entenderse que el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo. El término también abarca anticuerpos inalterados o de longitud completa, incluyendo anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluyendo IgG y sus subclases, IgM, IgE, IgA e IgD.

La expresión "anticuerpo antiidiotipo" se refiere a un anticuerpo, incluyendo fragmentos de unión a antígeno del mismo, que reconoce específicamente, está dirigido específicamente a y/o se une específicamente a un idiotipo de un anticuerpo, tal como un fragmento de unión a antígeno. Los idiotipos de un anticuerpo pueden incluir, pero no se limitan necesariamente a, residuos dentro de una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo, regiones variables del anticuerpo y/o porciones parciales o porciones de dichas regiones variables y/o de dichas CDR, y/o cualquier combinación de los anteriores. La CDR puede ser una o más seleccionadas del grupo que consiste en CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Las regiones variables del anticuerpo pueden

ser regiones variables de cadena pesada, regiones variables de cadena ligera o una combinación de las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera. Los fragmentos parciales o porciones de las regiones variables de cadena pesada y/o las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo pueden ser fragmentos que incluyen 2 o más, 5 o más o 10 o más aminoácidos contiguos, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 100, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, de aproximadamente 2 a aproximadamente 50, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos contiguos dentro de las regiones variables de cadena pesada o regiones variables de cadena ligera del anticuerpo; el idiotipo puede incluir múltiples tramos no contiguos de aminoácidos. Los fragmentos parciales de las regiones variables de la cadena pesada y de las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo pueden ser fragmentos que incluyen 2 o más, 5 o más o 10 o más aminoácidos contiguos, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 100, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, de aproximadamente 2 a aproximadamente 50, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos contiguos dentro de las regiones variables y en algunos casos contienen una o más CDR o fragmentos de CDR. Los fragmentos de CDR pueden ser 2 o más consecutivos o no consecutivos o 5 o más aminoácidos dentro de la CDR. Por lo tanto, los idiotipos del anticuerpo pueden ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 100, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, de aproximadamente 2 a aproximadamente 50, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos contiguos que contienen una o más CDR o uno o más fragmentos de CDR dentro de las regiones variables de cadena pesada o las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo. En otro caso, los idiotipos pueden ser un solo aminoácido que se encuentra en las regiones variables del anticuerpo, por ejemplo, sitios de CDR.

En algunos casos, el idiotipo es cualquier determinante antigénico o epítipo único dentro de la porción variable de un anticuerpo. En algunos casos, puede superponerse al sitio de unión al antígeno real del anticuerpo y, en algunos casos, puede comprender secuencias de región variable fuera del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. El conjunto de idiotipos individuales de un anticuerpo se denomina en algunos casos "idiotipo" de dicho anticuerpo.

Las expresiones "región determinante de la complementariedad" y "CDR", sinónimo de "región hipervariable" o "HVR", son conocidas en la técnica por referirse a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de regiones variables de anticuerpos, que confieren especificidad de antígeno y afinidad de unión. En general, hay tres CDR en cada región variable de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Las "regiones marco conservadas" y "FR" se conocen en la técnica para referirse a las porciones que no son CDR de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. En general, hay cuatro FR en cada región variable de cadena pesada de longitud completa (FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4) y cuatro FR en cada región variable de cadena ligera de longitud completa (FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4).

Los límites exactos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR dada se pueden determinar fácilmente usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"), MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745". (Esquema de numeración "Contact"), Lefranc MP *et al.*, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1): 55-77 (esquema de numeración "IMGT"), y Honegger A y Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, junio de 2001;8:309(3): 657-70, (Esquema de numeración "Aho").

Los límites de una determinada CDR o FR pueden variar según el esquema utilizado para la identificación. Por ejemplo, el esquema de Kabat se basa en alineamientos estructurales, mientras que el esquema de Chothia se basa en información estructural. La numeración de los esquemas de Kabat y Chothia se basa en las longitudes de secuencia de las regiones de anticuerpos más comunes, con inserciones acomodadas por letras de inserción, por ejemplo, "30a", y deleciones que aparecen en algunos anticuerpos. Los dos esquemas colocan determinadas inserciones y deleciones ("indels") en diferentes posiciones, dando como resultado la numeración diferencial. El esquema de Contact se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración de Chothia.

La Tabla 1, a continuación, enumera los límites de posición de ejemplo de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 identificados mediante los esquemas de Kabat, Chothia y esquemas de contacto, respectivamente. Para CDR-H1, la numeración de restos se enumera usando los esquemas de numeración de Kabat y Chothia. Las FR se ubican entre las CDR, por ejemplo, con FR-L1 ubicado entre CDR-L1 y CDR-L2, y así sucesivamente. Se observa que debido a que el esquema de numeración de Kabat que se muestra coloca inserciones en H35A y H35B, el final del bucle Chothia CDR-H1 cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat que se muestra varía entre H32 y H34, dependiendo de la longitud del bucle.

Tabla 1

CDR	Kabat	Chothia	Contacto
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (numeración de Kabat ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
CDR-H1 (Numeración de Chothia ²)	H31--H35	H26--H32	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H93--H101
1 - Kabat <i>et al.</i> (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 2 - Al-Lazikani <i>et al.</i> , (1997) JMB 273,927-948			

Por lo tanto, a menos que se especifique otra cosa, una "CDR" o "región determinante de complementariedad", o CDR específicas individuales (por ejemplo, "CDR-H1, CDR-H2), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, debe entenderse que abarca una (o la región determinante de complementariedad específica) definida por cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando se indica que una CDR particular (por ejemplo, una CDR-H3) contiene la secuencia de aminoácidos de una CDR correspondiente en una secuencia de aminoácidos de V_H o V_L dada, se entiende que dicha CDR tiene una secuencia de la CDR correspondiente (por ejemplo, CDR-H3) dentro de la región variable, tal como se define en cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente. En algunos casos, se especifican secuencias de CDR específicas.

De manera análoga, a menos que se especifique otra cosa, una FR o una FR individual especificada (por ejemplo, FR-H1, FR-H2), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, debe entenderse que abarca una región marco conservada (o la específica) definida por cualquiera de los esquemas conocidos. En algunos casos, se especifica el esquema de identificación de una CDR, FR, o varias FR o CDR particulares, tal como la CDR definida por el método de Kabat, Chothia o método de contacto. En otros casos, se proporciona la secuencia de aminoácidos particular de una CDR o FR.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (V_H y V_L, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) conservadas y tres CDR. (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6.ª ed., W. H. Freeman y Co., página 91 (2007). Un solo dominio V_H o V_L puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular se pueden aislar usando un dominio V_H o V_L de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios V_L o V_H complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991).

Entre los anticuerpos desvelados se encuentran fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une al antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En casos particulares, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región de cadena pesada variable y/o una región de cadena ligera variable, tal como scFvs.

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinados casos, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio.

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado, así como la producción por células hospedadoras recombinantes. En algunos casos, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no se dan de manera natural, tales como aquellos con dos o más regiones de anticuerpos o cadenas unidas por enlazadores sintéticos, por ejemplo, enlazadores peptídicos y/o que pueden no producirse por digestión enzimática de un anticuerpo inalterado de origen natural. En algunos aspectos, los fragmentos de anticuerpos son scFv.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de

CDR provienen de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de las regiones marco (FR) provienen de FR humanas. En algunos casos, las formas humanizadas de un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo murino, son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En determinados casos, los anticuerpos humanizados son anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. En algunos casos, un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo que proviene de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano, se refiere a una variante del anticuerpo no humano que se ha humanizado, normalmente para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano progenitor. En algunos casos, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la CDR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, Queen, patente de Estados Unidos N.º 5.585.089 y Winter, patente de Estados Unidos n.º 5.225.539.) Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica.

En determinados casos, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región variable de cadena pesada del receptor son sustituidos por residuos de una región variable de cadena pesada de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. En algunos casos, se alteran las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables humanas para reemplazar una o más secuencias CDR de la secuencia humana (aceptora) por una secuencia que codifica la CDR respectiva en la secuencia del anticuerpo no humano (secuencia donante). En algunos casos, la secuencia aceptora humana puede comprender FR derivados de diferentes genes. En casos particulares, un anticuerpo humanizado contendrá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. En algunos casos, el anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente, al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y las patentes de los EE.UU. N.º 6.982.321 y 7.087.409. En algunos casos, en el presente documento se divulgan anticuerpos antiidiotipo humanizados.

En casos particulares, un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo antiidiotipo, está humanizado. En determinados casos, el anticuerpo se humaniza mediante cualquier medio adecuado conocido. Por ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácido introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácido no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". En casos particulares, la humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) Science 239:1534-1536), tal como sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En determinados casos, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Las secuencias que codifican anticuerpos de longitud completa se pueden obtener posteriormente uniendo las secuencias de cadena pesada variable y cadena ligera variable obtenidas a las regiones de cadena pesada constante y cadena ligera constante humanas. Las secuencias de cadena ligera constante humana adecuadas incluyen secuencias de cadena ligera constante kappa y lambda. Las secuencias de cadena pesada constante humana adecuadas incluyen IgG1, IgG2 y secuencias que codifican mutantes de IgG1 que han adquirido propiedades inmunoestimulantes. Dichos mutantes pueden tener una capacidad reducida para activar la citotoxicidad celular dependiente del complemento y/o de anticuerpos y se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 5.624.821; documento WO 99/58572, la patente de Estados Unidos N.º 6.737.056. Una cadena pesada constante adecuada también incluye una IgG 1 que comprende las sustituciones E233P, L234V, L235A, A327G, A330S, P331S y una delección del resto 236. En otro caso, el anticuerpo de longitud completa comprende una secuencia de IgA, IgD, IgE, IgM, IgY o IgW.

Las secuencias donantes humanas adecuadas se pueden determinar mediante la comparación de secuencias de péptidos codificadas por las secuencias donantes de ratón con un grupo de secuencias humanas, preferentemente a secuencias codificadas por genes de inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de anticuerpos maduros.

Una secuencia humana con una alta homología de secuencia, preferentemente con la homología más alta determinada puede servir como secuencia aceptora para el proceso de humanización.

Además del intercambio de CDR humanas por CDR de ratón, se pueden realizar manipulaciones adicionales en la secuencia del donante humano para obtener una secuencia que codifique un anticuerpo humanizado con propiedades optimizadas (como la afinidad del antígeno).

Además, las secuencias de dominio variable de anticuerpo aceptor humano alteradas también pueden ser procesadas para codificar uno o más aminoácidos (según el sistema de numeración de Kabat) de la posición 4, 35, 38, 43, 44, 46, 58, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 85, 98 de la región variable ligera y 2, 4, 36, 39, 43, 45, 69, 70, 74, 75, 76, 78, 92 de la región variable pesada correspondiente a la secuencia donante no humana (Carter y Presta, patente de Estados Unidos N.º 6.407.213)

En casos particulares, habitualmente, es deseable que los anticuerpos se humanicen con la retención de una afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, en algunos casos, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno (o antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y muy sustancialmente implicados en la influencia de la unión a antígeno.

En casos particulares, la elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados puede ser muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que es la más cercana a la del roedor se acepta a continuación como la región marco conservada humana para el anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims *et al.* (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método utiliza un armazón particular obtenido de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Se puede usar la misma estructura para diferentes anticuerpos humanizados. Véase, por ejemplo, Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta *et al.* (1993) J. Immunol., 151:2623.

Entre los anticuerpos divulgados se encuentran anticuerpos humanos. Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humanas, incluyendo bibliotecas de anticuerpos humanos. La expresión excluye formas humanizadas de anticuerpos no humanos que comprenden regiones de unión a antígeno no humanas, tales como aquellas en las que todas o sustancialmente todas las CDR son no humanas.

Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos inalterados o anticuerpos inalterados con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígenos. Dichos animales normalmente contienen la totalidad o una porción de los loci de inmunoglobulina humanos, que sustituyen los locus endógenos de la inmunoglobulina, o que están presentes extracromosómicamente o integrados de forma aleatoria en los cromosomas de los animales. En dichos animales transgénicos, generalmente se han inactivado los locus de inmunoglobulina endógenos. Los anticuerpos humanos también pueden obtenerse de bibliotecas de anticuerpos humanos, incluyendo bibliotecas de presentación in vivo y sin células, que contienen secuencias codificantes de anticuerpos derivadas de un repertorio humano.

Entre los anticuerpos divulgados se encuentran los anticuerpos monoclonales, incluyendo fragmentos de anticuerpos monoclonales. La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de o en una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos, excepto por posibles variantes que contengan mutaciones naturales o que surjan durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes generalmente en cantidades minoritarias. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo epítipo en un antígeno. No debe interpretarse que el término requiera la producción del anticuerpo por cualquier método concreto. Un anticuerpo monoclonal se puede preparar mediante una variedad de técnicas, incluyendo pero sin limitación la generación a partir de un híbrido, métodos de ADN recombinante, la presentación in vivo y otros métodos de presentación de anticuerpos.

A. Anticuerpos derivados de SJ25C1

- En algunos casos, se divulgan anticuerpos antiidiotipo específicos para un anticuerpo anti-CD19 diana que es o se deriva del anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno divulgados son específicos de un scFv derivado de SJ25C1.
- En algunos casos, se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_H establecida en la SEQ ID NO: 1, tal como al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- En algunos casos, se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región variable de cadena pesada (V_H) que contiene una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (CDR-H3) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 11 u 84 y/o una CDR-H3 contenida dentro de la secuencia de la región variable de cadena pesada (V_H) establecida en la SEQ ID NO: 1.
- En algunos de estos casos, la región V_H incluye una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 9, 78, 79 u 80 y/o una CDR-H1 contenida dentro de la secuencia de V_H establecida en la SEQ ID NO: 1; y/o una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (CDR-H2) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 10, 81, 82 u 83 y/o una CDR-H2 contenida dentro de la secuencia de V_H establecida en la SEQ ID NO: 1.
- Se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1), CDR-H2 y CDR-H3, en donde la CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 9, 78, 79 u 80; la CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 10, 81, 82 u 83; y/o la CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 11 u 84. En algunos casos, se divulgan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 9, 78, 79 u 80; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 10, 81, 82 u 83; y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 11 u 84.
- Se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1), una CDR-H2 y una CDR-H3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de una CDR-H1, una CDR-H2, y una CDR-H3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_H establecida en la SEQ ID NO: 1.
- En algunos de estos casos, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, FR3 y/o FR4 que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunos casos, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, FR3 y/o FR4 que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunos casos, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, FR3 y/o FR4 que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1.
- En algunos de cualquiera de estos casos, la región V_H tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1.
- En algunos de estos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno es solo una cadena pesada, una V_H solo, y/o no incluye una V_L o una porción de unión al antígeno del mismo y/o el sitio de unión al antígeno del anticuerpo antiidiotipo o fragmento incluye solo restos de la cadena pesada y/o no incluye restos de una cadena ligera.
- En algunos de estos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento no contiene una región variable de cadena ligera (V_L), no contiene una CDR-L1, CDR-L2 y/o CDR-L3 y/o es un anticuerpo de dominio único (sdAb) que contiene solo la región V_H . En algunos casos, el anticuerpo o fragmento es un sdAb que solo contiene una región V_H de cualquiera de las descritas.
- En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos antiidiotipo o fragmentos que contienen cualquiera de las secuencias de la región V_H anteriores, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento comprende además una región variable de cadena ligera (V_L). En algunos de dichos casos, la región V_L tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_L establecida en la SEQ ID NO: 5, tal como al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_L .

establecida en la SEQ ID NO: 5.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende una región 3 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 14 u 87. En algunos de estos casos, la región V_L comprende una región 3 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR-L3) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 14 u 87.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 12 u 85 y/o una CDR-L1 contenida dentro de la secuencia de V_L establecida en la SEQ ID NO: 5; y/o una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 13 u 86 y/o una CDR-L2 contenida dentro de la secuencia de V_L establecida en la SEQ ID NO: 5. En algunos de estos casos, la región V_L contiene una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 12 u 85 y/o una CDR-L1 contenida dentro de la secuencia de V_L establecida en la SEQ ID NO: 5; y/o una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR-L2) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 13 u 86 y/o una CDR-L2 contenida dentro de la secuencia de V_L establecida en la SEQ ID NO: 5.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende una CDR-L1 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 12 u 85; una CDR-L2 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 13 u 86; y una CDR-L3 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 14 u 87.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de una CDR-L1, una CDR-L2 y una CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_L establecida en la SEQ ID NO: 5.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una FR2, una FR3 y/o una FR4 que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, respectivamente, con la FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5. En algunos casos, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, una FR3 y/o una FR4 que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5. En algunos casos, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, FR3 y/o FR4 que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5.

En algunos de estos casos, la región V_L tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5.

Se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_H establecida en la SEQ ID NO: 1; y/o comprenden las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (V_L) establecida en la SEQ ID NO: 5.

Se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen las regiones V_H y V_L que tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las SEQ ID NOS: 1 y 5, respectivamente.

En algunos casos, se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen las regiones V_H y V_L que tienen secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 1 y 5, respectivamente.

En algunos de estos casos, las regiones V_H y V_L incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 y 5, respectivamente.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo específico del anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo es un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla, tal como un scFv o diacuerpo. En algunos casos, el anticuerpo de cadena simple incluye uno o más enlazadores que se unen a dos dominios o regiones de anticuerpos, tal como una región de cadena pesada variable (V_H) y una cadena ligera variable (V_L). El enlazador normalmente es un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico flexible y/o soluble. Entre los enlazadores se encuentran los ricos en glicina y serina y/o en algunos casos treonina. En algunos casos, los enlazadores incluyen además restos cargados tales como lisina y/o glutamato, que pueden mejorar la solubilidad. En algunos casos, los enlazadores incluyen además una o más prolinas.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es un anticuerpo intacto o un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos, el anti-ID puede contener al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, tal como uno o más

dominios de región constante. En algunos casos, las regiones constantes incluyen una región constante de cadena ligera (CL) y/o una región constante de cadena pesada 1 (CH1). En algunos casos, el anti-ID incluye un dominio CH2 y/o CH3, tal como una región Fc. En algunos casos, la región Fc es una región Fc de una IgG humana, tal como IgG1 o IgG4. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo contiene el dominio CH establecido en LA SEQ ID NO: 2 o una porción del mismo o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 o una parte de la misma. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo contiene el dominio CL establecido en la SEQ ID NO: 6 o una porción del mismo o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 o una parte de la misma.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 comprende la secuencia de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y/o comprende la secuencia de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 7 o una secuencia que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo específico de SJ25C1 comprende la secuencia de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 3 y/o la secuencia de la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 7. En algunos casos, la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo antiidiotipo comprende además un péptido señal. En algunos casos, el péptido señal tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 8.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos de unión a antígeno del fragmento (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, un fragmento variable de cadena única (scFv) o un anticuerpo de dominio único (sdAb).

En consecuencia, se divulgan fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla, tales como scFv y diacuerpos, en particular, fragmentos de cadena simple humana, que comprenden típicamente enlazador(es) que unen dos dominios o regiones de anticuerpo antiidiotipo, tales como los dominios V_H y V_L. El enlazador normalmente es un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico flexible y/o soluble, tal como una rica en glicina y serina.

En algunos aspectos, los enlazadores ricos en glicina y serina (y/o treonina) incluyen al menos un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de dichos aminoácidos. En algunos casos, incluyen al menos o aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %, glicina, serina y/o treonina. En algunos casos, el enlazador está compuesto sustancialmente por completo de glicina, serina y/o treonina. Los enlazadores generalmente tienen entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, típicamente entre o aproximadamente 10 y en o aproximadamente 30, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, y en algunos ejemplos entre 10 y 25 aminoácidos de longitud. Los enlazadores ilustrativos incluyen enlazadores que tienen diversos números de repeticiones de la secuencia GGGS (3GS; SEQ ID NO: 29) o GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 26), tal como entre 2, 3, 4 y 5 repeticiones de dicha secuencia. Los enlazadores ilustrativos incluyen aquellos que tienen o consisten en una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 25 (GGGGSGGGSGGGGS). Los enlazadores ilustrativos incluyen además aquellos que tienen o consisten en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 33 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG).

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo incluyen anticuerpos aislados. En algunos casos, el anti-ID es humanizado, recombinante y/o monoclonal. En algunos casos, el anti-ID es humano.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 está humanizado. En casos particulares, todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de CDR del anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 se derivan de CDR no humanas anti-SJ25C1. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 incluye al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano.

En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 incluye una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de la región variable de la cadena pesada del receptor se reemplazan por restos de una región variable de la cadena pesada del anticuerpo antiidiotipo no humano específico para SJ25C1. En algunos casos, los restos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. En algunos casos, el anticuerpo humanizado contiene FR derivado de diferentes genes. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 contiene al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 contiene secuencias de dominio variable de anticuerpo aceptor humano alteradas que se han transformado para codificar uno o más residuos de aminoácidos de la posición 4, 35, 38, 43, 44, 46, 58, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 85, 98 (Kabat) de la región variable ligera y 2, 4, 36, 39, 43, 45, 69, 70, 74, 75, 76, 78, 92 (Kabat) de la región variable pesada correspondiente a la secuencia donante no humana.

En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 está humanizado. En casos particulares, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 contiene una o más de una región CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 de un anticuerpo antiidiotipo no humano que es específica para SJ25C1. En algunos casos, algunas o todas las regiones CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 contienen una o más modificaciones de aminoácidos. En algunos casos, las modificaciones que reemplazan un resto de aminoácido no humano por un resto humano. En casos particulares, la una o más de las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 se insertan en las regiones FR de un anticuerpo humano. En casos particulares, la CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano son las CDR de las regiones VH y VL que tienen secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 1 y 5, respectivamente. En algunos casos, todas las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 se insertan en las FR del anticuerpo humano. En casos particulares, las regiones CDR y FR son las regiones identificadas por Kabat, Chothia, Esquemas AbM, y/o y Contacto.

En casos particulares, una o más o todas las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano específico para SJ25C1 se insertan en regiones marco de un anticuerpo humano. En determinados casos, el anticuerpo humano es un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En casos particulares, el anticuerpo humano es uno de una subclase de IgA humana, IgD, IgE, IgG e IgM, por ejemplo, IgG1 humano, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂. En algunos casos, una o más o todas las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano específico para SJ25C1 se insertan en regiones marco de una región de unión a antígeno que proviene y/o se deriva de un anticuerpo humano. En determinados casos, el fragmento de unión a antígeno proviene y/o se deriva de un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM humano. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas humanas son bien conocidas y se han descrito generalmente en, por ejemplo, Abbas *et al. Cellular and Mol. Immunology*, 4^a ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). En algunos casos, el anticuerpo humano o su fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo humano con una o más proteínas o péptidos diferentes.

En algunos casos, una o más o todas las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano específico para SJ25C1 se insertan en regiones marco de un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene toda o una parte de una región Fc. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 contiene toda o una parte de una región Fc. En algunos casos, la región Fc tiene una o más modificaciones, tal como una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución, inserción o delección) en una o más posiciones de aminoácidos. Tales modificaciones se pueden realizar, por ejemplo, para mejorar la vida media, alterar la unión a uno o más tipos de receptores Fc y/o alterar las funciones efectoras. En algunos casos, las regiones Fc modificadas tienen una unión alterada (por ejemplo, disminuida) a los FcγR, con respecto a la de una región Fc no modificada. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado contiene toda o una parte de una región Fc modificada que tiene una unión alterada (por ejemplo, disminuida) al receptor Fc en relación con la de una región Fc no modificada. Se describen ejemplos no limitantes de modificaciones de Fc que alteran su unión a los receptores de Fc, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 7.217.797 y 7.732.570; y las solicitudes de Estados Unidos. N.º 2010/0143254 y 2010/0143254.

En determinados casos, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 132 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 133. En casos particulares, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 134 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 135. En algunos casos, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para SJ25C1 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 136 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 137.

B. Anticuerpos derivados de FMC63

En algunos casos, se divulgan anticuerpos antiidiotipo específicos para un anticuerpo anti-CD19 diana que es o se deriva del anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno divulgados son específicos de un scFv derivado de FMC63.

En algunos casos, se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_H establecida en la SEQ ID NO: 36 o 58, tal como al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.

En algunos casos, se divulgan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región VH que tiene una región determinante de la complementariedad 1 de cadena pesada (CDR-H1) que contiene la secuencia de aminoácidos de GYX₃FX₅X₆YX₈MX₁₀ (SEQ ID NO: 108), en donde X₃ es T o S, X₅ es T o S, X₆ es D o R, X₈ es Y o W, y X₁₀ es K o N; y/o una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (CDR-H2)

que contiene la secuencia de aminoácidos de WIGX₄IX₆PX₈X₉X₁₀X₁₁TX₁₃X₁₄NQX₁₇FKX₂₀ (SEQ ID NO: 109), en donde X₄ es D o M, X₆ es N o H, X₈ es N o S, X₉ es N o D, X₁₀ es G o S, X₁₁ es G o E, X₁₃ es D o R, X₁₄ es Y o L, X₁₇ es N o K y X₂₀ es G o D; y/o una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (CDR-H3) que contiene la secuencia de aminoácidos de AX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅ (SEQ ID NO: 110), en donde X₂ es R o S, X₃ es E o I, X₄ es G o Y, X₅ es N o Y, X₆ es N o E, X₇ es Y o nulo, X₈ es G o nulo, X₉ es S o nulo, X₁₀ es R o nulo, X₁₁ es D o nulo, X₁₂ es A o nulo, X₁₃ es M o nulo, X₁₄ es D o E y X₁₅ es Y o A.

En algunos casos, se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región variable de cadena pesada (VH) que contiene una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (CDR-H3) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 46, 67, 94 o 104 y/o una CDR-H3 contenida dentro de la secuencia de la región variable de cadena pesada (V_H) establecida en la SEQ ID NO: 36 o 58.

En algunos de estos casos, la región V_H incluye una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 44, 65, 88, 89, 90, 98, 99 o 100 y/o una CDR-H1 contenida dentro de la secuencia de V_H establecida en la SEQ ID NO: 36 o 58; y/o una región determinante de complementariedad de la cadena pesada 2 (CDR-H2) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 45, 66, 91, 92, 93, 101, 102 o 103 y/o una CDR-H2 contenida dentro de la secuencia de V_H establecida en las SEQ ID NO: 36 o 58.

Se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1), CDR-H2 y CDR-H3, en donde la CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 44, 65, 88, 89, 90, 98, 99 o 100; una CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 45, 66, 91, 92, 93, 101, 102 o 103; y/o la CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 46, 67, 94 o 104. En algunos casos, se divulgan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 44, 65, 88, 89, 90, 98, 99 o 100; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 45, 66, 91, 92, 93, 101, 102 o 103; y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 46, 67, 94 o 104.

Se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1), una CDR-H2 y una CDR-H3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de una CDR-H1, una CDR-H2, y una CDR-H3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_H establecida en la SEQ ID NO: 36 o 58.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una CDR-H1 establecida en las SEQ ID NOS: 44, 88, 89 o 90; una CDR-H2 establecida en las SEQ ID NOS: 45, 91, 92 o 93; y/o una CDR-H3 establecida en las SEQ ID NO: 46 o 94. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una CDR-H1 establecida en las SEQ ID NO: 65, 98, 99 o 100; una CDR-H2 establecida en las SEQ ID NO: 66, 101, 102 o 103; y/o una CDR-H3 establecida en las SEQ ID NO: 67 o 104, respectivamente.

En algunos de estos casos, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, FR3 y/o FR4 que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 36 o 58. En algunos casos, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, FR3 y/o FR4 que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 36 o 58. En algunos casos, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, FR3 y/o FR4 que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 36 o 58.

En algunos de cualquiera de estos casos, la región V_H tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 36 o 58.

En algunos de estos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno es solo una cadena pesada, una VH solo, y/o no incluye una VL o una porción de unión al antígeno del mismo y/o el sitio de unión al antígeno del anticuerpo antiidiotipo o fragmento incluye solo restos de la cadena pesada y/o no incluye restos de una cadena ligera.

En algunos de estos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento no contiene una región variable de cadena ligera (V_L), no contiene una CDR-L1, CDR-L2 y/o CDR-L3 y/o es un anticuerpo de dominio único (sdAb) que contiene solo la región V_H. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento es un sdAb que solo contiene una región VH de cualquiera de las descritas.

En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos antiidiotipo o fragmentos que contienen cualquiera de las secuencias de la región VH anteriores, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento comprende además una región variable

de cadena ligera (V_L). En algunos de dichos casos, la región V_L tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_L establecida en las SEQ ID NO: 40 o 62, tal como al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_L establecida en las SEQ ID NO: 40 o 62.

En algunos casos, se divulgan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región VH que tiene una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que contiene la secuencia de aminoácidos de $X_1AX_3X_4X_5X_6X_7X_8YX_{10}X_{11}WY$ (SEQ ID NO: 111), en donde X_1 es S o R, X_3 es S o R, X_4 es S o G, X_5 es G o N, X_6 es V o I, X_7 es I o H, X_8 es N o nulo, X_{10} es M o L y X_{11} es Y o A; y/o una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (CDR-L2) que contiene la secuencia de aminoácidos de $X_1X_2X_3YX_5X_6X_7X_8LAX_{11}$ (SEQ ID NO: 112), en donde X_1 es P o L, X_2 es W o L, X_3 es I o V, X_5 es L o N, X_6 es T o A, X_7 es S o K, X_8 es N o T y X_{11} es S o D; y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR-L3) que contiene la secuencia de aminoácidos de $QX_2X_3X_4X_5X_6PX_8T$ (SEQ ID NO: 113), donde X_2 es Q o H, X_3 es W o F, X_4 es S o W, X_5 es S o W, X_6 es N o T y X_8 es I o Y.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende una región 3 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 49, 97, 70 o 107. En algunos de estos casos, la región V_L comprende una región 3 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR-L3) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 49, 97, 70 o 107.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 47, 68, 95 o 105 y/o una CDR-L1 contenida dentro de la secuencia de V_L establecida en la SEQ ID NO: 40 o 62; y/o una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 48, 69, 96 o 106 y/o una CDR-L2 contenida dentro de la secuencia de V_L establecida en la SEQ ID NO: 40 o 62. En algunos de estos casos, la región V_L contiene una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 47, 68, 95 o 105 y/o una CDR-L1 contenida dentro de la secuencia de V_L establecida en la SEQ ID NO: 40 o 62; y/o una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR-L2) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 48, 69, 96 o 106 y/o una CDR-L2 contenida dentro de la secuencia de V_L establecida en la SEQ ID NO: 40 o 62.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende una CDR-L1 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 47, 68, 95 o 105; una CDR-L2 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 48, 69, 96 o 106; y una CDR-L3 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 49, 97, 70 o 107.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de una CDR-L1, una CDR-L2 y una CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_L establecida en la SEQ ID NO: 40 o 62.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una CDR-L1 establecida en las SEQ ID NOS: 47 o 95; una CDR-L2 establecida en las SEQ ID NOS: 48 o 96; y/o una CDR-L3 establecida en las SEQ ID NO: 49 o 97. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una CDR-L1 establecida en las SEQ ID NO: 68 o 105; una CDR-L2 establecida en las SEQ ID NO: 69 o 106; y/o una CDR-L3 establecida en las SEQ ID NO: 70 o 107, respectivamente.

En algunos de estos casos, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una FR2, una FR3 y/o una FR4 que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, respectivamente, con la FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 40 o 62. En algunos casos, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, una FR3 y/o una FR4 que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 40 o 62. En algunos casos, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, FR3 y/o FR4 que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y FR4 de la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 40 o 62.

En algunos de estos casos, la región V_L tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 40 o 62.

Se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_H establecida en la SEQ ID NO: 36 o 58; y/o comprenden las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (V_L) establecida en la SEQ ID NO: 40 o 62.

Se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen la región V_H que

tiene secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las SEQ ID NOS: 36 o 58 y la región V_L que tiene secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las SEQ ID NOS: 40 o 62.

- 5 En algunos casos, se divulgan anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen la región V_H que tiene secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 36 o 58 y la región V_L que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 40 o 62. En algunos casos, el anticuerpo divulgado contiene la región V_H establecida en la SEQ ID NO: 36 y la región V_L establecida en la SEQ ID NO: 40. En algunos casos, el anticuerpo divulgado contiene la región V_H establecida en la SEQ ID NO: 58 y la región V_L establecida en la SEQ ID NO: 62.

- 10 En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es un fragmento de anticuerpo de cadena única, tal como un scFv o diacuerpo. En algunos casos, el anticuerpo de cadena simple incluye uno o más enlazadores que se unen a dos dominios o regiones de anticuerpos, tal como una región de cadena pesada variable (V_H) y una cadena ligera variable (V_L). El enlazador normalmente es un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico flexible y/o soluble. Entre los enlazadores se encuentran los ricos en glicina y serina y/o en algunos casos treonina. En algunos casos, los enlazadores incluyen además restos cargados tales como lisina y/o glutamato, que pueden mejorar la solubilidad. En algunos casos, los enlazadores incluyen además una o más prolinas.

- 20 En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es un anticuerpo intacto o un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos, el anti-ID puede contener al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, tal como uno o más dominios de región constante. En algunos casos, las regiones constantes incluyen una región constante de cadena ligera (CL) y/o una región constante de cadena pesada 1 (CH1). En algunos casos, el anti-ID incluye un dominio CH2 y/o CH3, tal como una región Fc. En algunos casos, la región Fc es una región Fc de una IgG humana, tal como IgG1 o IgG4. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo contiene el dominio CH establecido en LA SEQ ID NO: 37 o 59 o una porción del mismo o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 37 o 59 o una parte de la misma. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo contiene el dominio CL establecido en SEQ ID NO: 41 o 63 o una porción del mismo o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 41 o 63 o una parte de la misma.

- 35 En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo específico para FMC63 comprende la secuencia de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 38 o 60 o una secuencia que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 38 o 60 y/o comprende la secuencia de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 42 o 63 o una secuencia que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 42 o 63. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo específico de FMC63 comprende la secuencia de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 38 y/o la secuencia de la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 42. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo específico de FMC63 comprende la secuencia de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 60 y/o la secuencia de la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 63. En algunos casos, la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo antiidiotipo comprende además un péptido señal. En algunos casos, el péptido señal tiene la secuencia establecida en las SEQ ID NO: 39, 43, 61 o 64.

- 45 En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos de unión a antígeno del fragmento (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, un fragmento variable de cadena única (scFv) o un anticuerpo de dominio único (sdAb).

- 50 En consecuencia, se divulgan fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla, tales como scFv y diacuerpos, en particular, fragmentos de cadena simple humana, que comprenden típicamente enlazador(es) que unen dos dominios o regiones de anticuerpo antiidiotipo, tales como los dominios V_H y V_L. El enlazador normalmente es un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico flexible y/o soluble, tal como una rica en glicina y serina.

- 55 En algunos aspectos, los enlazadores ricos en glicina y serina (y/o treonina) incluyen al menos un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de dichos aminoácidos. En algunos casos, incluyen al menos o aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %, glicina, serina y/o treonina. En algunos casos, el enlazador está compuesto sustancialmente por completo de glicina, serina y/o treonina. Los enlazadores generalmente tienen entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, típicamente entre o aproximadamente 10 y en o aproximadamente 30, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, y en algunos ejemplos entre 10 y 25 aminoácidos de longitud. Los enlazadores ilustrativos incluyen enlazadores que tienen diversos números de repeticiones de la secuencia GGGS (3GS; SEQ ID NO: 29) o GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 26), tal como entre 2, 3, 4 y 5 repeticiones de dicha secuencia. Los enlazadores ilustrativos incluyen aquellos que tienen o consisten en una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 25 (GGGSGGGSGGGGS). Los enlazadores ilustrativos incluyen además aquellos que tienen o consisten en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 33 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG).

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo incluyen anticuerpos aislados. En algunos casos, el anti-ID es humanizado, recombinante y/o monoclonal. En algunos casos, el anti-ID es humano.

5 En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo específico para FMC63 está humanizado. En casos particulares, todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de CDR del anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 se derivan de CDR anti-FMC63 no humanas. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 incluye al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano.

10 En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 incluye una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de la región variable de la cadena pesada del receptor se reemplazan por restos de una región variable de la cadena pesada del anticuerpo antiidiotipo no humano específico para FMC63. En algunos casos, los restos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. En algunos casos, el anticuerpo humanizado contiene FR derivado de diferentes genes. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 contiene al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

20 En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 contiene secuencias de dominio variable de anticuerpo aceptor humano alteradas que se han transformado para codificar uno o más residuos de aminoácidos de la posición 4, 35, 38, 43, 44, 46, 58, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 85, 98 (Kabat) de la región variable ligera y 2, 4, 36, 39, 43, 45, 69, 70, 74, 75, 76, 78, 92 (Kabat) de la región variable pesada correspondiente a la secuencia donante no humana.

25 En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo específico para FMC63 está humanizado. En casos particulares, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 contiene una o más de una CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 de un anticuerpo antiidiotipo no humano específico para FMC63. En algunos casos, algunas o todas las regiones CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 contienen una o más modificaciones de aminoácidos. En algunos casos, las modificaciones que reemplazan un resto de aminoácido no humano por un resto humano. En casos particulares, la una o más de las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 se insertan en regiones FR humanas. En casos particulares, la CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano son las CDR de las regiones VH que tienen secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 36 o 58. En determinados casos, las CDR de la región VH antiidiotipo no humano son o incluyen una CDR-H1 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 44, 35 65, 88, 89, 90, 98, 99 o 100; la CDR-H2 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 45, 66, 91, 92, 93, 101, 102 o 103; y/o la CDR-H3 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 46, 67, 94 o 104. En algunos casos, la CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano son las CDR de las regiones VL que tienen secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 40 o 62. En algunos casos, las CDR de la región VL antiidiotipo no humano son o incluyen una CDR-L1 40 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 47, 68, 95 o 105; una CDR-L2 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 48, 69, 96 o 106; y una CDR-L3 que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 49, 97, 70 o 107. En algunos casos, todas las regiones CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo específico para FMC63 se insertan en las FR del anticuerpo humano. En casos particulares, las regiones CDR y FR son las regiones identificadas por Kabat, Chothia, 45 Esquemas AbM, y/o y Contacto.

En casos particulares, una o más o todas las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano específico para FMC63 se insertan en regiones marco de un anticuerpo humano. En determinados casos, el anticuerpo humano es un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En casos particulares, el anticuerpo humano es uno de una subclase de IgA humana, IgD, IgE, IgG e IgM, por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂ humanas. En algunos casos, una o más o todas las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano específico para FMC63 se insertan en regiones marco de una región de unión a antígeno que proviene y/o se deriva de un anticuerpo humano. En determinados casos, el fragmento de unión a antígeno proviene y/o se deriva de un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM humano. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas humanas son bien conocidas y se han descrito generalmente en, por ejemplo, Abbas *et al. Cellular and Mol. Immunology*, 4^a ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). En algunos casos, el anticuerpo humano o su fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo humano con una o más proteínas o péptidos diferentes.

60 En algunos casos, una o más o todas las CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 del anticuerpo antiidiotipo no humano específico para FMC63 se insertan en regiones marco de un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene toda o una parte de una región Fc. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 contiene toda o una parte de una región Fc. En algunos casos, la región Fc tiene una o más modificaciones, tal como una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución, inserción o delección) en una o más posiciones de aminoácidos. Tales modificaciones se pueden realizar, por ejemplo, 65

para mejorar la vida media, alterar la unión a uno o más tipos de receptores Fc y/o alterar las funciones efectoras. En algunos casos, las regiones Fc modificadas tienen una unión alterada (por ejemplo, disminuida) a los Fc α R, con respecto a la de una región Fc no modificada. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo humanizado contiene toda o una parte de una región Fc modificada que tiene una unión alterada (por ejemplo, disminuida) al receptor Fc en relación con la de una región Fc no modificada. Se describen ejemplos no limitantes de modificaciones de Fc que alteran su unión a los receptores de Fc, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 7.217.797 y 7.732.570; y las solicitudes de Estados Unidos. N.º 2010/0143254 y 2010/0143254.

En determinados casos, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 138 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 139. En casos particulares, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 140 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 141. En algunos casos, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 142 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 143. En determinados casos, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 144 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 145. En casos particulares, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 146 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 147. En algunos casos, un anticuerpo antiidiotipo humanizado específico para FMC63 tiene una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 148 y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 149.

C. Características ilustrativas

Los anticuerpos antiidiotipo divulgados en el presente documento pueden identificarse, someterse a detección sistemática o caracterizarse respecto de sus propiedades fisicoquímicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos. En un aspecto, el anticuerpo antiidiotipo se prueba para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, por métodos conocidos tales como ELISA, análisis por transferencia de Western y/o ensayos de citometría de flujo, incluyendo los ensayos de unión basados en células, por ejemplo, evaluar la unión del anticuerpo antiidiotipo (por ejemplo, conjugado con un marcador fluorescente o marcado) a una célula que presenta la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana, en algunos casos en comparación con los resultados obtenidos utilizando células que no expresan la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana. La afinidad de unión se puede medir como K_d o CE₅₀.

En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos divulgados, por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos divulgados en la Sección A anterior, la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana es SJ25C1 o es un anticuerpo derivado de SJ25C1.

En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos divulgados, por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos divulgados en la Sección B anterior, la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana es FMC63 o es un anticuerpo derivado de FMC63.

Se pueden usar ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compita con cualquiera de los anticuerpos antiidiotipo descritos en el presente documento. También se pueden usar y son conocidos ensayos para mapear epítopos unidos por los anticuerpos antiidiotipo y anticuerpos de referencia.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo no reacciona de forma cruzada con una fracción de anticuerpo anti-CD19 diferente de la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana. En algunos casos, la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana se deriva del anticuerpo SJ25C1. En algunos casos, la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana se deriva del anticuerpo SJ25C1 y el anticuerpo antiidiotipo no reacciona de forma cruzada con una fracción de anticuerpo anti-CD19 derivada del anticuerpo FMC63, un anticuerpo anti-CD19 que comprende una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana se deriva del anticuerpo FMC63. En algunos casos, la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana se deriva del anticuerpo FMC63 y el anticuerpo antiidiotipo no reacciona de forma cruzada con una fracción de anticuerpo anti-CD19 derivada del anticuerpo SJ25C1, el anticuerpo anti-CD19 que comprende una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se une específicamente a una fracción de anticuerpo anti-CD19 diana que forma parte de una proteína de fusión, tal como un receptor recombinante. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo no se une a ningún epítipo en la proteína de fusión fuera de la fracción de anticuerpo anti-CD 19 diana. Por ejemplo, en algunos casos, la fracción de anticuerpo anti-CD 19 diana es, o es parte de, el dominio de unión al antígeno de un receptor de antígeno quimérico (CAR) y el anticuerpo antiidiotipo no se une a ningún epítipo fuera del dominio de unión al antígeno. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CAR comprende o consiste en un scFv.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se une específicamente a una fracción de anticuerpo anti-CD19 diana que es un scFv contenido en un CAR. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se une específicamente a un epítipo

que se superpone a una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del scFv anti-CD19 diana. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo no se une a ningún epítipo en el CAR fuera del scFv; en algunos casos, no se une a un anticuerpo de referencia. En algunos casos, el anticuerpo de referencia se une específicamente al mismo antígeno que el anticuerpo diana, por ejemplo, al CD19 y/o comprende una o más regiones de marco pesadas variables y/o ligeras variables que tienen al menos un 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad con la o las regiones marco correspondientes del anticuerpo diana (en algunos aspectos, las una o más regiones marco comprenden una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la cadena pesada y/o ligera); y/o contiene el mismo gen v de cadena pesada y/o ligera (o uso del gen v) que el anticuerpo diana y/o se deriva de la misma secuencia del gen v que el anticuerpo diana. En algunos aspectos, el anticuerpo de referencia es FMC63. En algunos aspectos, el anticuerpo de referencia es SJ25C1.

En algunos casos, el CAR comprende un espaciador que une el scFv a su dominio transmembrana y el anticuerpo antiidiotipo no se une a ningún epítipo en el espaciador. En algunos casos, el espaciador es una secuencia derivada de CD28, tal como una porción extracelular de CD28. En algunos casos, el espaciador comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo no se une a ningún epítipo en un dominio Fc, tal como el dominio Fc de IgG1. En algunos casos, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 que carece de la región bisagra. En algunos casos, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo no reacciona de forma cruzada con un CAR diferente. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo no reacciona de forma cruzada con un CAR anti-CD19 diferente. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo no reacciona de forma cruzada con una fracción de anticuerpo anti-CD19, por ejemplo, de un anticuerpo de referencia, que tiene uno o más idiotipos diferentes en comparación con el scFv anti-CD19 diana. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es específico para un scFv anti-CD19 diana de un CAR derivado del anticuerpo SJ25C1. En algunos casos, la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana se deriva del anticuerpo SJ25C1 y el anticuerpo antiidiotipo no reacciona de forma cruzada con un CAR que contiene una fracción de anticuerpo anti-CD19 derivada del anticuerpo FMC63. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es específico para un scFv anti-CD19 diana de un CAR derivado del anticuerpo FMC63. En algunos casos, la fracción de anticuerpo anti-CD19 diana se deriva del anticuerpo FMC63 y el anticuerpo antiidiotipo no reacciona de forma cruzada con un CAR que contiene la fracción de anticuerpo anti-CD19 derivada del anticuerpo SJ25C1.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es un agonista del CAR. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es un antagonista del CAR.

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo divulgados son capaces de unirse a una fracción anti-CD19 diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, con al menos cierta afinidad, medido por cualquiera de una serie de métodos conocidos. En algunos casos, la afinidad está representada por una constante de disociación en equilibrio (K_D); en algunos casos, la afinidad está representada por la CE_{50} . En determinados casos, la afinidad de unión (CE_{50}) y/o la constante de disociación del anticuerpo antiidiotipo a la fracción anti-CD19 es igual o inferior o aproximadamente inferior a o aproximadamente 100 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM, tal como entre igual o aproximadamente 1 nM e igual o aproximadamente 15 nM, por ejemplo, entre igual o aproximadamente 5 e igual o aproximadamente 10 nM. En un caso, el grado de unión de un anticuerpo antiidiotipo a una fracción no relacionada con la fracción anti-CD19 diana es menor que, igual o aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a la fracción anti-CD19 diana según lo medido, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés).

D. Ácidos nucleicos

También se divulgan ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y/o porciones, por ejemplo, cadenas, de los mismos. Entre los ácidos nucleicos divulgados se encuentran los que codifican los anticuerpos antiidiotipo descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden incluir los que abarcan nucleótidos y bases naturales y/o no naturales, por ejemplo, incluidos aquellos con modificaciones en la estructura principal. Las expresiones "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" y "polinucleótido" se pueden usar indistintamente y se refieren a un polímero de nucleótidos. Dichos polímeros de nucleótidos pueden contener nucleótidos naturales y/o no naturales e incluyen, pero no se limitan a, ADN, ARN y PNA. "Secuencia de ácido nucleico" se refiere a la secuencia lineal de nucleótidos que comprende la molécula de ácido nucleico o polinucleótido. Los ácidos nucleicos y vectores ilustrativos son aquellos que tienen las secuencias establecidas como las SEQ ID NO: 15-22, 50-57, 71-77 y porciones codificantes de CDR de los mismos, así como secuencias que contienen al menos un o aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad con las mismas. El ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la V_L y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la V_H del anticuerpo antiidiotipo (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo).

También se divulgan vectores que contienen los ácidos nucleicos, las células hospedadoras que contienen los vectores, por ejemplo, para producir los anticuerpos. También se divulgan métodos para producir los anticuerpos. En un caso adicional, se divulgan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En un caso adicional, se divulga una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos casos, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la V_L del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la V_H del anticuerpo o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica

una secuencia de aminoácidos que comprende la V_L del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la V_H del anticuerpo. En algunos casos, se divulga un método para fabricar el anticuerpo antiidiotipo, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se ha divulgado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o del medio de cultivo de la célula hospedadora).

E. Métodos de producción de anticuerpos

También se divulgan métodos para fabricar un anticuerpo antiidiotipo, tal como cualquiera de los casos divulgados. En algunos casos, para la producción recombinante del anticuerpo antiidiotipo, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente, se puede aislar e insertar en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación se han modificado para imitar o aproximarse a las de las células humanas, dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Véanse Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004) y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006).

Las células eucariotas ilustrativas que se pueden usar para expresar polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, células COS, incluyendo células COS 7; células 293, incluyendo células 293-6E; células CHO, incluyendo CHO-S, DG44. Células Lec13 CHO y células FUT8 CHO; células PER.C6®; y células NSO. En algunos casos, las cadenas pesadas y/o cadenas ligeras del anticuerpo se pueden expresar en levaduras. Véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos N.º US 2006/0270045 A1. En algunos casos, se selecciona una célula hospedadora eucariota particular en función de su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales deseadas en las cadenas pesadas y/o cadenas ligeras. Por ejemplo, en algunos casos, las células CHO producen polipéptidos que tienen un mayor nivel de sialilación que el mismo polipéptido producido en células 293.

En algunos casos, se produce un anticuerpo antiidiotipo en un sistema libre de células. Se describen ejemplos de sistemas libres de células, por ejemplo, en Sitaraman *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

Algunos casos divulgados incluyen además vectores y células hospedadoras y otros sistemas de expresión para expresar y producir los anticuerpos y otras proteínas de unión, incluyendo células hospedadoras eucariotas y procariotas, incluyendo bacterias, hongos filamentosos y levaduras, así como células de mamíferos tales como células humanas, así como sistemas de expresión libres de células.

Los anticuerpos antiidiotipo o fracciones de anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la CDR provienen de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la FR provienen de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo que proviene de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano, se refiere a una variante del anticuerpo no humano que se ha humanizado, normalmente para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano progenitor. En algunos casos, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la CDR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Entre los anticuerpos antiidiotipo o fracciones de anticuerpos divulgados se encuentran los anticuerpos humanos. Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humanas, incluyendo bibliotecas de anticuerpos humanos. La expresión excluye formas humanizadas de anticuerpos no humanos que comprenden regiones de unión a antígeno no humanas, tales como aquellas en las que todas o sustancialmente todas las CDR son no humanas.

Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos inalterados o anticuerpos inalterados con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígenos. Dichos animales normalmente contienen la totalidad o una porción de los loci de inmunoglobulina humanos, que sustituyen los locus endógenos de la inmunoglobulina, o que están presentes extracromosómicamente o integrados de forma aleatoria en los cromosomas de los animales. En dichos animales transgénicos, generalmente se han inactivado los locus de inmunoglobulina endógenos. Los anticuerpos humanos también pueden obtenerse de bibliotecas de anticuerpos humanos, incluyendo bibliotecas de presentación en fago y sin células, que contienen secuencias codificantes de anticuerpos derivadas de un repertorio humano.

F. Inmunoconjugados

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo es o forma parte de un inmunoconjugado (inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo), en el que el anticuerpo antiidiotipo se conjuga con una o más moléculas heterólogas, tales como, pero sin limitación, un citotóxico o un agente de obtención de imágenes. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu); agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, maitansinoides, taxanos, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas. En algunos casos, el anticuerpo está conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), o isótopos radiactivos.

Entre los inmunoconjugados de anticuerpos antiidiotipo se encuentran los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF), en los que un anticuerpo antiidiotipo se conjuga con uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitación, un maitansinoide (véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1); una auristatina, tales como los restos DE y DF de monometilauristatina (MMAE y MMAF) (véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina (véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman et al., Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993); y Lode et al., Cancer Res. 58: 2925-2928 (1998)); una antraciclina, tal como daunomicina o doxorubicina (véanse Kratz et al., Current Med. Chem. 13: 477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16: 358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16: 717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45: 4336-4343 (2002); y la patente de Estados Unidos N.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano, tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

También entre los inmunoconjugados de anticuerpos antiidiotipo se encuentran aquellos en los que el anticuerpo está conjugado con una toxina enzimáticamente activa o un fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitación, cadena A de difteria, fragmentos activos que no son fragmentos de unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, α-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y tricotecenos.

También entre los inmunoconjugados de anticuerpos antiidiotipo se encuentran aquellos en los que el anticuerpo antiidiotipo se conjuga a un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Los isótopos radiactivos ilustrativos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu.

Se pueden preparar conjugados de un anticuerpo antiidiotipo y un agente citotóxico usando cualquiera de una serie de agentes de acoplamiento de proteínas conocidos, por ejemplo, enlazadores, (véase Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)), documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula, tal como enlazadores lábiles al ácido, enlazadores sensible a peptidasa, enlazadores fotolábiles, enlazadores de dimetilo o enlazadores que contienen disulfuro (Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992); la Patente de Estados Unidos N.º 5.208.020).

También se divulgan inmunoconjugados de anticuerpos antiidiotipo que comprenden un anticuerpo antiidiotipo unido a un marcador, por ejemplo, un marcador detectable, que pueden generar una señal detectable, indirecta o directamente. Estos inmunoconjugados de anticuerpos antiidiotipo se pueden utilizar para aplicaciones de investigación o diagnóstico. El marcador es preferentemente capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el marcador puede ser radioopaco o un radioisótopo, tales como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I; un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tales como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tales como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente de formación de imágenes; o un ion de metal. En algunos casos, el marcador es un átomo radiactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, ⁹⁹Tc o ¹²³I o un marcador de espín para obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes por resonancia magnética, IRM, por sus siglas en inglés), tales como circonio-89, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. El circonio-89 puede formar complejos con diversos agentes quelantes metálicos y conjugarse a anticuerpos, por ejemplo, para la adquisición de imágenes PET (documento WO 2011/056983).

Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, pero sin limitación, radionucleótidos, enzimas, coenzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Los ejemplos de enzimas

adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de complejos con grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina, cumarina, Alexa488, Verde Oregón 488, rodamina verde, Alexa 532, Cy3, Bodipy 588/586, Alexa586, TAMRA, Rox, Alexa 594, rojo Texas, Bodipy 630/650, Cy5, Alexa647, IR Colorante 680, IR Colorante 680, IR Colorante 700 DX, Cy5.5, Alexa 750, IR Colorante 800CW, IR Colorante 800, Atto 532 y Atto 465.

En algunos casos, el inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo es detectable indirectamente. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo secundario que sea específico para el inmunoconjugado del anticuerpo antiidiotipo y que contenga una etiqueta detectable para detectar el inmunoconjugado del anticuerpo antiidiotipo.

Anticuerpos multiespecíficos

En determinados casos, los anticuerpos antiidiotipo son multiespecíficos. Entre las moléculas de unión multiespecíficas se encuentran los anticuerpos multiespecíficos, que incluyen, por ejemplo, parejas de unión biespecíficas, multiespecíficas, por ejemplo, anticuerpos, tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes, que pueden estar en el mismo o en diferentes antígenos. En determinados casos, una de las especificidades de unión es por una fracción de anticuerpo anti-CD19 y la otra es para otro antígeno. En determinados casos, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de una fracción de anticuerpo anti-CD19. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan una fracción de anticuerpo anti-CD19 en su superficie, tales como linfocitos T CAR anti-CD19. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo. Entre los anticuerpos multiespecíficos se encuentran los anticuerpos de cadena única multiespecíficos, por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem y tri-scFv en tándem.

G. Variantes

En determinados casos, los anticuerpos antiidiotipo incluyen una o más variaciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones, deleciones, inserciones y/o mutaciones, en comparación con la secuencia de un anticuerpo antiidiotipo descrito en el presente documento. Las variantes ilustrativas incluyen aquellas diseñadas para mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo antiidiotipo. Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo antiidiotipo mediante la introducción de modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo antiidiotipo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo antiidiotipo. Puede realizarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, divulgado de que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, la unión a antígeno.

En determinados casos, los anticuerpos antiidiotipo incluyen una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en comparación con una secuencia de anticuerpos antiidiotipo descrita en el presente documento. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las CDR y las FR. En un anticuerpo antiidiotipo pueden introducirse sustituciones de aminoácidos y los productos pueden cribarse para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, disminución de la inmunogenicidad, vida media mejorada y/o función efectora mejorada, tal como la capacidad para promover la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo variante exhibe una unión retenida o mejorada a un anticuerpo anti-CD19 diana o fragmento del mismo. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo variante exhibe un aumento en la afinidad de unión al anticuerpo anti-CD19 diana de al menos aproximadamente el 10 % (tal como al menos aproximadamente cualquiera de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 % o más) en comparación con el anticuerpo antiidiotipo no modificado.

En algunos casos, uno o más restos dentro de una CDR de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano) está/n sustituidos. En algunos casos, la sustitución se realiza para revertir una secuencia o posición en la secuencia a una secuencia de línea germinal, tal como una secuencia de anticuerpos que se encuentra en la línea germinal (por ejemplo, la línea germinal humana), por ejemplo, para reducir la probabilidad de inmunogenicidad, por ejemplo, tras la administración a un individuo humano.

En algunos casos, se realizan alteraciones en los "puntos calientes" de las CDR, restos codificados por codones que experimentan mutación con elevada frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) y/o restos que entran en contacto con el antígeno, con la variante resultante de V_H o V_L siendo probada para la afinidad de unión. La maduración por afinidad mediante la construcción y reselección de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, Nueva Jersey, (2001)). En algunos casos de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para su maduración mediante cualquiera de diversos métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Después, se crea una biblioteca secundaria. Después, la biblioteca se explora para identificar

cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica estrategias dirigidas a las CDR, en las que se aleatorizan varios restos de CDR (por ejemplo, 4-6 restos a la vez). Los restos de CDR implicados en la unión al antígeno se pueden identificar de manera específica, por ejemplo, usando mutagénesis por barrido de alanina o modelización. Con frecuencia, se usan como diana, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados casos, sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más CDR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden hacer alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se divulgan en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las CDR. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, estar fuera de los restos de contacto con el antígeno en las CDR. En determinados casos de las variantes de secuencias de V_H y V_L divulgadas anteriormente, cada CDR bien está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Las inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo con un intervalo de longitudes de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones en los extremos incluyen un anticuerpo con un resto metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Modificaciones

En determinados casos, el anticuerpo se altera para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glicosilado, por ejemplo, eliminando o insertando uno o más sitios de glicosilación alterando la secuencia de aminoácidos y/o modificando los oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación, por ejemplo, usando ciertas líneas celulares.

Modificaciones ilustrativas, variantes y líneas celulares se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente N.º US 2003/0157108, US 2004/0093621, US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0157108 A1, Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4): 680-688 (2006); y el documento WO2003/085107; el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente de Estados Unidos n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*); el documento WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y en el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

Entre los anticuerpos modificados se encuentran los que tienen una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc, tales como los que tienen una secuencia de la región Fc humana u otra parte de una región constante (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

Tales modificaciones se pueden realizar, por ejemplo, para mejorar la vida media, alterar la unión a uno o más tipos de receptores Fc y/o alterar las funciones efectoras.

También entre las variantes se encuentran los anticuerpos modificados con cisteína tales como "thioMAbs" y otras variantes modificadas con cisteína, en las que se sustituyen uno o más restos de un anticuerpo por restos de cisteína, para generar grupos de tiol reactivos en sitios accesibles, por ejemplo, para su uso en la conjugación de agentes y agentes enlazadores, para producir inmunoconjugados. Se describen anticuerpos modificados con cisteína, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 7.855.275 y 7.521.541.

En algunos casos, los anticuerpos se modifican para contener restos no proteínicos adicionales, incluyendo polímeros solubles en agua. Los polímeros ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o sin ramificar. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que han de mejorarse, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

II. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIIDIOTIPO

- En algunos casos, se divulga un método para identificar un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un anticuerpo diana o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como mediante el uso de métodos de hibridoma con un inmunógeno que comprende el anticuerpo diana o un fragmento del mismo (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975) y Sergeeva *et al.*, *Blood*, 117(16): 4262-4272). El inmunógeno puede comprender una fracción potenciadora de la inmunogenicidad fusionada al anticuerpo diana o fragmento. Esta fracción potenciadora de la inmunogenicidad puede tener propiedades que incluyen, sin limitación, aumento de la solubilidad y la semivida del inmunógeno. Las fracciones potenciadoras de la inmunogenicidad ilustrativas incluyen dominios Fc o fragmentos de los mismos. En algunos casos, la fracción potenciadora de la inmunogenicidad es un dominio Fc (tal como de IgG1, opcionalmente humano). En algunos casos, la fracción potenciadora de la inmunogenicidad es un dominio Fc (tal como de IgG1, opcionalmente humano) que carece de toda o una parte de la región bisagra.
- En algunos casos, se divulga un método para identificar un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un anticuerpo diana o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende: (a) introducir en un sujeto un inmunógeno soluble que comprende un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo diana fusionado a una fracción potenciadora de la inmunogenicidad; y (b) identificar un anticuerpo del sujeto que se une específicamente al anticuerpo diana o a fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento de cadena única. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno es un scFv. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno está dentro o incluido en el dominio de unión al antígeno de la porción extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR).
- En algunos casos, la fracción potenciadora de la inmunogenicidad es un dominio Fc o fragmento del mismo, que opcionalmente es un Fc de IgG1 humana. En algunos casos, la fracción potenciadora de la inmunogenicidad es un dominio Fc que carece de la región bisagra. En algunos casos, la fracción potenciadora de la inmunogenicidad comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 32.
- En algunos casos, la identificación del anticuerpo comprende el uso de técnicas de hibridoma para identificar clones de anticuerpos individuales producidos por el sujeto y examinar los clones para determinar su unión al anticuerpo diana o a fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, la identificación del anticuerpo comprende: (i) aislar linfocitos B del bazo del sujeto y fusionarlas con linfocitos B inmortalizados para generar hibridomas; (ii) examinar los hibridomas para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno del mismo o a un receptor de antígeno quimérico que comprende el fragmento de unión a antígeno; y (iii) secuenciar un anticuerpo de un hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno, identificando así el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la detección de un hibridoma comprende determinar la afinidad de unión del anticuerpo del hibridoma por una molécula diana que comprende el anticuerpo diana o un idiotipo del anticuerpo diana, tal como un scFv o un CAR o fragmento del mismo que comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL. En algunos casos, la detección de un hibridoma comprende además determinar la afinidad de unión del anticuerpo del hibridoma por una molécula no diana que no comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como un Fc o fragmento del mismo u otro anticuerpo o fragmento del mismo que no comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL, en donde la unión del anticuerpo de hibridoma a la molécula diana pero no a la molécula no diana indica que el anticuerpo de hibridoma se une específicamente al anticuerpo diana.
- En algunos de estos casos, el método comprende: (a) introducir en un sujeto un inmunógeno soluble que comprende un scFv del anticuerpo diana fusionado a un dominio Fc o un fragmento del mismo; y (b) identificar un anticuerpo del sujeto que se une específicamente a una molécula que comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como el inmunógeno. En algunos casos, el scFv está dentro o incluido en el dominio de unión al antígeno de la porción extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el dominio Fc o un fragmento del mismo es un Fc de IgG1 humana o un fragmento del mismo. En algunos casos, el dominio Fc o fragmento del mismo es un dominio Fc que carece de la región bisagra. En algunos casos, el dominio Fc o fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 32. En algunos casos, la identificación del anticuerpo comprende el uso de técnicas de hibridoma para identificar clones de anticuerpos individuales producidos por el sujeto y examinar los clones de anticuerpos para determinar su unión a una molécula que comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como el inmunógeno. En algunos casos, la identificación del anticuerpo comprende: (i) aislar linfocitos B del bazo del sujeto y fusionarlas con linfocitos B inmortalizados para generar hibridomas; (ii) examinar los hibridomas para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una molécula que comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como el inmunógeno; y (iii) secuenciar un anticuerpo de un hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente a una molécula que comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como el inmunógeno, identificando así el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la detección de un hibridoma comprende determinar la afinidad de unión del anticuerpo del hibridoma por una molécula diana que comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como el inmunógeno, un scFv o un CAR o fragmento del mismo que comprende la región de

cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL. En algunos casos, la detección de un hibridoma comprende además determinar la afinidad de unión del anticuerpo del hibridoma por una molécula no diana que no comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como un Fc o fragmento del mismo u otro anticuerpo o fragmento del mismo que

- 5 no comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL, en donde la unión del anticuerpo de hibridoma a la molécula diana pero no a la molécula no diana indica que el anticuerpo de hibridoma se une específicamente al anticuerpo diana.
- 10 En algunos de estos casos, el método comprende: (a) introducir en un sujeto un inmunógeno soluble que comprende un scFv del anticuerpo diana fusionado a un dominio Fc o un fragmento del mismo; y (b) identificar un anticuerpo del sujeto que (i) se une a una molécula que comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como el inmunógeno, un scFv o un CAR o fragmento del mismo que comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL;
- 15 y (ii) no se une a una molécula no diana que no comprende un idiotipo del anticuerpo diana, tal como un Fc o fragmento del mismo u otro anticuerpo o fragmento del mismo que no comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo diana, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL. En algunos casos, el scFv está dentro o incluido en el dominio de unión al antígeno de la porción extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el dominio Fc o un fragmento del mismo es un Fc de IgG1 humana o un fragmento del mismo. En algunos casos, el dominio Fc o fragmento del mismo es un dominio Fc que carece de la región bisagra. En algunos casos, el dominio Fc o fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 32. En algunos casos, la identificación del anticuerpo comprende el uso de técnicas de hibridoma para identificar clones de anticuerpos individuales producidos por el sujeto y examinar los clones para determinar la unión de los clones de anticuerpo a las moléculas diana y no diana. En
- 20 algunos casos, la identificación del anticuerpo comprende: (i) aislar linfocitos B del bazo del sujeto y fusionarlas con linfocitos B inmortalizados para generar hibridomas; (ii) examinar los hibridomas para detectar la producción de anticuerpos que se unen a la molécula diana pero no a la molécula no diana; y (iii) secuenciar un anticuerpo de un hibridoma que produce un anticuerpo que se une a la molécula diana pero no a la molécula no diana, identificando así el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la detección de un hibridoma comprende determinar la afinidad de unión del anticuerpo del hibridoma por la molécula diana y la molécula no diana.

En algunos de estos casos, el método comprende: (a) introducir en un sujeto un inmunógeno soluble que comprende un scFv derivado del anticuerpo FMC63 (tal como un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34) fusionado a un dominio Fc o un fragmento del mismo; y (b) identificar un anticuerpo del sujeto que (i) se une a una molécula que comprende un idiotipo del anticuerpo FMC63, tal como el inmunógeno, un scFv o un CAR o fragmento del mismo que comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo FMC63, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL; y (ii) no se une a una molécula no diana que no comprende un idiotipo del anticuerpo FMC63, tal como un Fc o fragmento del mismo u otro anticuerpo o fragmento del mismo que no comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo FMC63, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL. En algunos casos, el inmunógeno comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO:32, opcionalmente separados por un enlazador, por ejemplo, establecido en la SEQ ID NO:33. En algunos casos, el inmunógeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35. En algunos casos, el anticuerpo identificado en (b) se une al inmunógeno y no se une ni a un dominio Fc ni a un fragmento del mismo ni a una molécula que comprende un scFv derivado del anticuerpo SJ25C1 (tal como un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28). En algunos casos, el anticuerpo identificado en (b) se une a una molécula diana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 o 35 y no se une ni a una molécula no diana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 ni a una molécula no diana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.

- 50 En algunos de estos casos, el método comprende: (a) introducir en un sujeto un inmunógeno soluble que comprende un scFv derivado del anticuerpo SJ25C1 (tal como un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28) fusionado a un dominio Fc o un fragmento del mismo; y (b) identificar un anticuerpo del sujeto que (i) se une a una molécula que comprende un idiotipo del anticuerpo SJ25C1, tal como el inmunógeno, un scFv o un CAR o fragmento del mismo que comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo SJ25C1, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL; y (ii) no se une a una molécula no diana que no comprende un idiotipo del anticuerpo SJ25C1, tal como un Fc o fragmento del mismo u otro anticuerpo o fragmento del mismo que no comprende la región de cadena pesada variable y/o la región de cadena ligera variable del anticuerpo SJ25C1, o porciones de las mismas, tal como una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL. En algunos casos, el inmunógeno comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 28 y la SEQ ID NO:32, opcionalmente separados por un enlazador, por ejemplo, establecido en la SEQ ID NO:33. En algunos casos, el anticuerpo identificado en (b) se une al inmunógeno y no se une ni a un dominio Fc ni a un fragmento del mismo ni a una molécula que comprende un scFv derivado del anticuerpo FMC63 (tal como un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34). En algunos casos, el anticuerpo identificado en (b) se une a una molécula diana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 y no se une ni a una molécula no diana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 ni a una molécula no diana

que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

En algunos casos, la identificación del anticuerpo comprende el uso de técnicas de hibridoma para identificar clones de anticuerpos individuales producidos por el sujeto y examinar los clones para determinar la unión de los clones de anticuerpo a las moléculas diana y no diana. En algunos casos, la identificación del anticuerpo comprende: (i) aislar linfocitos B del bazo del sujeto y fusionarlas con linfocitos B inmortalizados para generar hibridomas; (ii) examinar los hibridomas para detectar la producción de anticuerpos que se unen a la molécula diana pero no a la molécula no diana; y (iii) secuenciar un anticuerpo de un hibridoma que produce un anticuerpo que se une a la molécula diana pero no a la molécula no diana, identificando así el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la detección de un hibridoma comprende determinar la afinidad de unión del anticuerpo del hibridoma por la molécula diana y la molécula no diana.

En un caso de ejemplo, la identificación de anticuerpos antiidiotipo que reconocen la porción scFv de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR) ilustrativo que contiene un scFv anti-CD19 derivado de SJ25C1 se puede generar utilizando un inmunógeno que comprende la secuencia que se establece a continuación:

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQLEWIGQIYPGDG
DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYW
GQGTTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGT
NVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFC QQYNRYPYTSGGGTKLEIKR
(SEQ ID NO: 28). En algunos casos, el inmunógeno puede contener además un dominio Fc o un fragmento del mismo, por ejemplo, como se establece en la SEQ ID NO:32.

En un caso de ejemplo, la identificación de anticuerpos antiidiotipo que reconocen la porción scFv de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR) ilustrativo que contiene un scFv anti-CD19 derivado de FMC63 se puede generar utilizando un inmunógeno que comprende la secuencia que se establece a continuación:

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPG
SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG
VIWGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYA
MDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:34).

En algunos casos, el inmunógeno puede contener además un dominio Fc o un fragmento del mismo, por ejemplo, como se establece en la SEQ ID NO:32. En algunos casos, la identificación de anticuerpos antiidiotipo que reconocen la porción scFv de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR) ilustrativo que contiene un scFv anti-CD19 derivado de FMC63 se puede generar utilizando un inmunógeno que comprende la secuencia que se establece a continuación:

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35).

III. RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS (CARS) Y CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotípicos divulgados se unen específicamente a una porción de unión al antígeno de un receptor de antígeno quimérico (CAR), tal como un CAR anti-CD 19 que contiene una porción de unión al antígeno derivada del anticuerpo SJ25C1 o FMC63. En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo divulgados se unen a dichos CAR expresados en una célula, tal como las células utilizadas en relación con la terapia celular adoptiva. En algunos casos, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante genomodificación, y de ese modo expresan los productos CAR recombinantes o genomodificados de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos,

los receptores quiméricos, cuando se modifican genéticamente en las células inmunitarias, pueden modular la actividad de los linfocitos T, y, en algunos casos, pueden modular la diferenciación o la homeostasis de los linfocitos T, obteniéndose de este modo células modificadas genéticamente con mayor longevidad, supervivencia y/o persistencia *in vivo*, tal como para uso en métodos de terapia celular adoptiva. En algunos casos, los anticuerpos antiidiotípicos divulgados se pueden utilizar en métodos para modular una o más de estas actividades, incluyendo para activar, estimular y/o expandir células diseñadas que expresan el CAR diana.

En algunos casos, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética de acuerdo con los métodos divulgados y de ese modo expresan productos recombinantes o genomodificados de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como una obtenida de otro organismo o célula, que, por ejemplo, normalmente no se encuentra en la célula que se está modificando por ingeniería y/o en un organismo del que se obtiene dicha célula. En algunos casos, los ácidos nucleicos no son de origen natural, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluyendo uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican diversos dominios de múltiples tipos de células diferentes. En casos particulares, los ácidos nucleicos contienen un gen que codifica un CAR.

En algunos casos, los métodos divulgados pueden llevarse a cabo simultáneamente, secuencialmente o simultáneamente con una o más etapas de procesamiento para fabricar o preparar células modificadas genéticamente. Las etapas de procesamiento de los métodos pueden incluir uno o más de varias etapas de procesamiento celular, solos o en combinación. En casos particulares, las etapas de procesamiento incluyen la transducción o transfección de las células con uno o más ácidos nucleicos, por ejemplo, un polinucleótido heterólogo que comprende un gen que codifica un receptor recombinante. En determinados casos, las células se transducen con partículas de vector vírico que contienen un vector retrovírico, tal como uno que codifica un producto recombinante para su expresión en las células. En determinados casos, las células se transfectan con uno o más ácidos nucleicos no víricos, por ejemplo, un plásmido episomal o un transposón. Los métodos pueden incluir además y/o alternativamente otras etapas de procesamiento, tales como etapas para el aislamiento, separación, selección, lavado, suspensión, dilución, concentración y/o formulación de las células. En algunos casos, los métodos también pueden incluir una etapa *ex vivo* para el cultivo, estimulación o expansión de células (por ejemplo, estimulación de las células, por ejemplo, para inducir su proliferación y/o activación), que, en algunos casos, puede llevarse a cabo de acuerdo con los métodos divulgados. En algunos casos, los métodos incluyen aislar células del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o diseñarlas y reintroducirlas en el mismo sujeto, antes o después de su crioconservación.

En algunos casos, el método incluye etapas de procesamiento realizadas en un orden en el cual: células, por ejemplo, células primarias, se aíslan primero, tal como por selección o separación, de una muestra biológica; las células seleccionadas se incuban con partículas de vector vírico para la transducción; y las células transducidas se formulan en una composición. En algunos casos, las células transducidas se activan, expanden o propagan *ex vivo*, tal como mediante estimulación en presencia de un reactivo de estimulación, de acuerdo con los métodos divulgados. En algunos casos, el método puede incluir una o más etapas de procesamiento entre las que se incluyen lavado, suspensión, dilución y/o concentración de las células, que puede ocurrir antes de, durante o simultáneamente con o después de uno o más de las etapas de aislamiento, tal como separación o selección, transducción, estimulación y/o formulación.

En casos particulares, las células que se van a transfectar o transducir no se aíslan, seleccionan ni enriquecen antes del contacto con los uno o más ácidos nucleicos. En algunos casos, las células no se seleccionan antes de ponerlas en contacto con el uno o más ácidos nucleicos. En algunos casos, las células que se van a transfectar o transducir no se enriquecen antes de ponerlas en contacto con los uno o más ácidos nucleicos.

En algunos casos, una o más de las etapas de procesamiento celular en relación con la preparación, procesamiento y/o incubación de las células en relación con el método divulgado, incluso en relación con la preparación de una composición que contenga células modificadas genéticamente, puede llevarse a cabo en la cavidad interna de una cámara centrífuga, tal como una cámara sustancialmente rígida que generalmente tiene forma cilíndrica y puede girar alrededor de un eje de rotación, que puede aportar determinadas ventajas frente a otros métodos disponibles. En algunos casos, todas las etapas de procesamiento se llevan a cabo en la misma cámara centrífuga. En algunos casos, una o más etapas de procesamiento se llevan a cabo en diferentes cámaras centrífugas, tal como múltiples cámaras centrífugas del mismo tipo. Dichos métodos incluyen cualquiera de los descritos en la publicación internacional número WO2016/073602.

Algunos ejemplos de cámaras centrífugas incluyen las producidas y vendidas por Biosafe SA, incluidas las que se utilizan con el sistema Sepax® y Sepax® 2, incluidas las cámaras centrífugas A-200/F y A-200 y diversos kits para su uso con dichos sistemas. Ejemplos de cámaras, sistemas e instrumentos de procesamiento y armarios se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.123.655, la Patente de Estados Unidos n.º 6.733.433 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada, N.º de publicación: US 2008/0171951, y solicitud de patente internacional publicada, publicación N.º WO 00/38762. Dependiendo del proceso en particular (por ejemplo, dilución, lavado, transducción, formulación), está dentro del nivel de un experto en la técnica elegir un kit particular que sea apropiado para el proceso. Algunos ejemplos de kits para usar con estos sistemas son, pero no se limitan a, kits de un solo uso

vendidos por BioSafe SA con el nombre de producto CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 o CS-900.2.

En algunos casos, el sistema está incluido con y/o asociado con otros instrumentos, incluidos los instrumentos para operar, automatizar, controlar y/o monitorizar aspectos de las diversas etapas de procesamiento realizadas en el sistema. En algunos casos, estos instrumentos están contenidos dentro de un armario. En algunos casos, los instrumentos incluyen un armario, que incluye una carcasa que contiene circuitos de control, una centrífuga, una cubierta, motores, bombas, sensores, pantallas y una interfaz de usuario. Un dispositivo ilustrativo se describe en la patente de Estados Unidos N.º 6.123.655, la patente de Estados Unidos N.º 6.733.433 y el documento US 2008/0171951.

En algunos casos, el sistema comprende una serie de recipientes, por ejemplo, bolsas, tubos, llaves de paso, abrazaderas, conectores, y una cámara de centrifugado. En algunos casos, los contenedores, tales como bolsas, incluyen uno o más recipientes, tales como bolsas, que contiene las células que se van a transducir o transfectar y las partículas del vector, por ejemplo, partículas de vectores víricos o plásmidos no víricos, en el mismo recipiente o en recipientes separados, tal como la misma bolsa o bolsas separadas. En algunos casos, el sistema incluye además uno o más recipientes, tales como bolsas, que contienen medio, tal como diluyente y/o solución de lavado, que se introduce en la cámara y/o en otros componentes para diluir, resuspender y/o lavar los componentes y/o composiciones durante los métodos. Los recipientes pueden conectarse en una o más posiciones del sistema, tal como en una posición correspondiente a una línea de entrada, línea de diluyente, línea de lavado, línea de residuos y/o línea de salida.

En algunos casos, el sistema, tal como un sistema cerrado, es estéril. En algunos casos, todas las conexiones de los componentes del sistema, tal como entre una línea de tubería y un contenedor a través de un conector, se realizan en condiciones estériles. En algunos casos, las conexiones se realizan bajo flujo laminar. En algunos casos, las conexiones se realizan mediante un dispositivo de conexión estéril que produce conexiones estériles, tales como soldaduras estériles, entre un tubo y un recipiente. En algunos casos, un dispositivo de conexión estéril efectúa la conexión en condiciones térmicas lo suficientemente altas para mantener la esterilidad, tales como temperaturas de al menos el 200 °C, tal como de al menos 260 °C o 300 °C.

En algunos casos, el sistema puede ser desechable, tal como un kit de un solo uso. En algunos casos, un kit de un solo uso puede utilizarse en una pluralidad de ciclos de un proceso o procesos, tal como al menos 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, en procesos que ocurren de manera continua o semicontinua. En algunos casos, el sistema, tal como un kit de un solo uso, se utiliza para procesar células de un solo paciente. En aspectos de los métodos, los procesos no necesitan realizarse en el mismo sistema cerrado, tal como en la misma cámara centrífuga, pero pueden realizarse bajo un sistema cerrado diferente, tal como en una cámara centrífuga diferente; en algunos casos, estas diferentes cámaras centrífugas se encuentran en los puntos respectivos de los métodos colocados en asociación con el mismo sistema, tal como colocados en asociación con la misma centrífuga. En algunos casos, todas las etapas de procesamiento se realizan en un sistema cerrado, en el que la totalidad o un subconjunto de cada uno o más pasos de procesamiento se realiza en la misma cámara centrífuga o en una diferente.

A. Receptores de antígenos quiméricos diana (CAR)

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotípicos divulgados se unen específicamente al dominio extracelular de un CAR diana que contiene un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que proporciona especificidad para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) y que está operativamente unido o conectado a un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno incluye el anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de anticuerpo o porción derivado de SJ25C1. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno incluye el anticuerpo FMC63 o un fragmento de anticuerpo o porción derivado de FMC63. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular es una porción de dominio intracelular activador, tal como un dominio activador de linfocitos T, que proporciona una señal de activación primaria. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular contiene o contiene adicionalmente un dominio de señalización coestimulador para facilitar las funciones efectoras.

En algunos casos, se divulgan células manipuladas genéticamente, tales como linfocitos T, se divulga que expresan un CAR con especificidad para un antígeno particular (o marcador o ligando), tal como un antígeno expresado en la superficie de un tipo celular particular. En algunos casos, el antígeno es un polipéptido. En algunos casos, es un hidrato de carbono u otra molécula. En algunos casos, el antígeno se expresa o se sobreexpresa selectivamente en células de la enfermedad o afección, por ejemplo, las células tumorales o patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otros casos, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células diseñadas.

En casos particulares, el receptor recombinante, tal como un receptor quimérico, contiene una región de señalización intracelular, que incluye un dominio de señalización citoplasmática (también denominado indistintamente dominio de señalización intracelular), tal como una región citoplasmática (intracelular) capaz de inducir una señal de activación primaria en un linfocito T, por ejemplo, un dominio de señalización citoplasmática de un componente del receptor de linfocitos T (TCR) (por ejemplo, un dominio de señalización citoplasmática de una cadena zeta de una cadena CD3-

zeta (CD3ζ) o una variante funcional o porción de señalización de la misma) que comprende un motivo de activación inmunoceptor basado en tirosina (ITAM).

En algunos casos, el receptor quimérico contiene además un dominio extracelular de unión a ligando que se une específicamente a un ligando (por ejemplo, antígeno). En algunos casos, el receptor quimérico es un CAR que contiene un dominio extracelular de reconocimiento de antígeno que se une específicamente a un antígeno. En algunos casos, el ligando, tal como un antígeno, es una proteína que se expresa en la superficie de las células. En algunos casos, el CAR es un CAR de tipo TCR y el antígeno es un antígeno peptídico procesado, tal como un antígeno peptídico de una proteína intracelular, que, al igual que un TCR, es reconocido en la superficie celular en el contexto de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*).

Los receptores de antígenos ilustrativos, incluidos los CAR, y los métodos para genomodificar e introducir dichos receptores en las células, incluyen los descritos, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional número WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos número US2002131960, US2013287748, US20130149337, en las patentes de Estados Unidos N.º: 6451995, 7.446.190, 8252592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353 y 8.479.118, y la solicitud de patente europea número EP2537416, y/o los descritos por Sadelain *et al.*, Cancer Discov. abril de 2013; 3(4): 388-398; Davila *et al.* (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle *et al.*, Curr. Opin. Immunol., octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu *et al.*, Cancer, 18 de marzo de 2012 (2): 160-75. En algunos aspectos, los receptores de antígeno incluyen un CAR como se describe en la patente de Estados Unidos N.º: 7.446.190 y los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional N.º: WO/2014055668 A1. Como ejemplos de los CAR se incluyen los CAR que se desvelan en cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, tal como el documento WO2014031687, la patente de Estados Unidos N.º 8.339.645, la patente de Estados Unidos N.º 7.446.179, US 2013/0149337, la patente de Estados Unidos N.º: 7446190, la patente de Estados Unidos N.º: 8.389.282, Kochenderfer *et al.*, 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang *et al.* (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; y Brentjens *et al.*, Sci Transl Med. 2013 5(177). Véanse también los documentos WO2014031687, la patente de Estados Unidos N.º 8.339.645, la patente de Estados Unidos N.º 7.446.179, US 2013/0149337, la patente de Estados Unidos N.º: 7.446.190 y la patente de Estados Unidos N.º: 8.389.282.

En algunos casos, el CAR se construye con una especificidad para un antígeno particular (o marcador o ligando), tal como un antígeno expresado en un tipo de célula particular al que se dirigirá la terapia adoptiva, por ejemplo, un marcador de cáncer y/o un antígeno previsto para inducir una respuesta amortiguadora, tal como un antígeno expresado en un tipo de célula normal o no enferma. Por lo tanto, el CAR incluye normalmente en su porción extracelular una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos de unión a antígeno, dominio, o porción, o uno o más dominios variables de anticuerpo, y/o moléculas de anticuerpo. En algunos casos, el CAR incluye una porción de unión a antígeno o porciones de una molécula de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) que proviene de las cadenas pesada variable (VH, *variable heavy*) y ligera variable (VL, *variable light*) de un anticuerpo monoclonal (mAb, *monoclonal antibody*).

En algunos casos, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se expresa en células como parte de un CAR. Generalmente, un CAR que contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que presenta una especificidad similar al TCR dirigida contra complejos péptido-MHC, también puede denominarse CAR similar al TCR. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno extracelular específico para un complejo MHC-péptido de un CAR similar al TCR, está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, en algunos aspectos a través de enlazadores y/o dominio(s) transmembrana. En algunos casos, dichas moléculas normalmente imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, tal como un TCR, y, opcionalmente, una señal a través de dicho receptor junto con un receptor coestimulador.

En algunos casos, el receptor recombinante, tal como un receptor quimérico (por ejemplo CAR), incluye un dominio de unión a ligando que se une, tal como se une específicamente, a un antígeno (o a un ligando). Entre los antígenos dirigidos por los receptores quiméricos se encuentran los expresados en el contexto de una enfermedad, afección o tipo de célula a la que se dirigirá a través de la terapia celular adoptiva. Entre las enfermedades y afecciones se encuentran los trastornos y enfermedades proliferativos, neoplásicos y malignos, incluidos cánceres y tumores, incluidos cánceres hemáticos, cánceres del sistema inmunitario, tales como linfomas, leucemias y/o mielomas, tal como por ejemplo leucemias de linfocitos B, T y mieloides, linfomas y mieloma múltiple.

En algunos casos, el antígeno (o un ligando) es un polipéptido. En algunos casos, es un hidrato de carbono u otra molécula. En algunos casos, el antígeno (o un ligando) se expresa o se sobreexpresa selectivamente en las células de la enfermedad o afección, por ejemplo, las células tumorales o patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otros casos, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células diseñadas.

En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, scFv) que reconoce específicamente un antígeno, tal como un antígeno intacto, expresado en la superficie de una célula.

En algunos casos, el antígeno (o un ligando) es un antígeno tumoral o marcador de cáncer. En algunos casos, el

antígeno (o un ligando) es integrina $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha\beta 6$), El antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD 171, proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteína truncada del factor de crecimiento epidérmico (tEGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR VIII), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHA2), receptor de estrógenos, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5; también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína fijadora de folato (FBP), receptor alfa de folato, receptor de acetilcolina fetal, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glucoproteína 100 (gp100), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) humano, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor IL-13 alfa 2 (IL-13Ra2), receptor del dominio de inserción de la quinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula L1 de adhesión celular (L1CAM), epitopo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de linfocitos citolíticos naturales, grupo 2, miembro D (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, del inglés "prostate specific membrane antigen"), receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina quinasa (ROR1), survivina, glicoproteína del trofoblasto (TPBG también conocida como 5T4), glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico del patógeno, un antígeno asociado con un marcador universal y/o moléculas biotiniladas y/o moléculas expresadas por y/o características de o específicas del VIH, VHC, VHB, VPH y/u otros patógenos y/o versiones oncogénicas del mismo. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con una neoplasia de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

En algunos casos, el antígeno es un antígeno específico del patógeno. En algunos casos, el antígeno es un antígeno vírico (tal como un antígeno vírico del VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parasitarios.

Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con una neoplasia de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30. En algunos casos, el antígeno es CD19 y está unido específicamente por un anticuerpo anti-CD19, tal como SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno derivado de SJ25C1 o FMC63 o un fragmento de unión a antígeno derivado de FMC63.

En algunos casos, las proteínas de unión a antígeno, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, reconocen específicamente un antígeno de un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos, las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo pueden ser de longitud completa o pueden ser una porción de unión a antígeno (un Fab, F(ab')₂, Fv o un Fv monocatenario (scFv)). En otros casos, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo se elige entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, especialmente se elige entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, más particularmente, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). En otro caso, la región constante de cadena ligera del anticuerpo se elige entre, por ejemplo, kappa o lambda, particularmente kappa.

Entre los anticuerpos desvelados se encuentran fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une al antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; regiones variables de cadena pesada (VH), moléculas de anticuerpos monocatenarios tales como scFv y anticuerpos simples de dominio único VH; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En casos particulares, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región de cadena pesada variable y/o una región de cadena ligera variable, tal como scFvs.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) conservadas y tres CDR. (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6.^a ed., W. H. Freeman y Co., página 91 (2007)). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinados casos, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio. En algunos casos, el CAR comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente al antígeno, tal como un marcador de cáncer o un antígeno de superficie celular de una célula o enfermedad a la que se dirige, tal como una célula tumoral o una célula cancerosa, tal como cualquiera de los antígenos diana descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado, así como la producción por células hospedadoras recombinantes. En algunos casos, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no se dan de manera natural, tales como aquellos con dos o más regiones de anticuerpos o cadenas unidas por enlazadores sintéticos, por ejemplo, enlazadores peptídicos y/o que pueden no producirse por digestión enzimática de un anticuerpo inalterado de origen natural. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpos son scFv.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la CDR provienen de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la FR provienen de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo que proviene de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano, se refiere a una variante del anticuerpo no humano que se ha humanizado, normalmente para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano progenitor. En algunos casos, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la CDR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los receptores quiméricos, tales como los CAR, suelen incluir un dominio extracelular de unión a antígeno, tal como una porción de una molécula de anticuerpo (por ejemplo, SJ25C1 o FMC63), generalmente una región de cadena pesada variable (VH) y/o una región de cadena ligera variable (VL) del anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo scFv.

En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv. En algunos casos, el scFv se deriva de SJ25C1 y comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 28. En algunos casos, el scFv se deriva de FMC63 y comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 34.

En algunos casos, el receptor recombinante tal como el CAR, tal como la porción de anticuerpo del mismo, además incluye un espaciador, que puede ser o incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o una variante o versión modificada de la misma, tal como una región de bisagra, por ejemplo, una región de bisagra de IgG4 y/o una región CH1/CL y/o Fc. En algunos casos, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos aspectos, la porción de la región constante sirve como una región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, scFv y dominio transmembrana. El espaciador puede tener una longitud que proporcione una mayor capacidad de respuesta de la célula después de la unión del antígeno, en comparación con en ausencia del espaciador. En algunos ejemplos, el espaciador tiene aproximadamente 12 aminoácidos de longitud o no tiene más de 12 aminoácidos de longitud. Los espaciadores ilustrativos incluyen aquellos que tienen al menos de aproximadamente 10 a 229 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 200 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 175 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 150 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 125 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 100 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 30 aminoácidos, de aproximadamente de 10 a 20 aminoácidos, o de aproximadamente de 10 a 15 aminoácidos y que incluyen cualquier número entero entre los extremos de cualquiera de los intervalos enumerados. En algunos casos, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos, o aproximadamente 229 aminoácidos o menos. Los espaciadores ilustrativos incluyen solo la bisagra de IgG4, la bisagra de IgG4 unida a los dominios CH2 y CH3, o la bisagra de IgG4 unida al dominio CH3. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 150, y está codificada por la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 151. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 152. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 153. Los espaciadores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Hudecek *et al.* (2013) Clin. Cancer Res., 19: 3153, publicación de solicitud de patente internacional número WO2014031687, la patente US-8.822.647 o solicitud publicada. n.º US2014/0271635.

En algunos casos, la región o porción constante es de IgD. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 154. En algunos casos, el espaciador tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de

identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 5.

En algunos casos, el receptor de antígeno comprende un dominio intracelular unido directa o indirectamente al dominio extracelular. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que une el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio transmembrana se fusiona con el dominio extracelular. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende un ITAM. Por ejemplo, en algunos aspectos, el dominio de reconocimiento del antígeno (por ejemplo, el dominio extracelular) generalmente está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, tales como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo de receptor de antígeno, tal como un complejo de TCR, en el caso de un CAR, y/o señal a través de otro receptor de superficie celular. En algunos casos, el receptor quimérico comprende un dominio transmembrana unido o fusionado entre el dominio extracelular (por ejemplo, scFv) y el dominio de señalización intracelular. Por lo tanto, en algunos casos, el componente de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) está unido a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelular.

En un caso, se usa un dominio transmembrana que se asocia de manera natural con uno de los dominios en el receptor, por ejemplo CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o se modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o de diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

El dominio transmembrana, en algunos casos, procede de una fuente natural o de una fuente sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio, en algunos aspectos, proviene de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen las derivadas de (es decir, comprenden al menos la región o regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154. Como alternativa, en algunos casos, el dominio transmembrana es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos aspectos, un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se encontrará en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunos casos, el enlace es mediante enlazadores, espaciadores y/o dominio(s) transmembrana. En algunos aspectos, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28.

En algunos casos, el dominio extracelular y el dominio transmembrana se pueden unir directa o indirectamente. En algunos casos, el dominio extracelular y el transmembrana están unidos por un espaciador, tal como cualquiera descrito en el presente documento. En algunos casos, el receptor contiene la porción extracelular de la molécula de la que deriva el dominio transmembrana, tal como una porción extracelular de CD28.

Entre los dominios de señalización intracelular se encuentran aquellos que imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador, y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunos casos, un enlazador de oligopéptido o polipeptídico corto, por ejemplo, un enlazador de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, tal como uno que contiene glicinas y serinas, por ejemplo, doblete de glicina-serina, está presente y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR.

La activación de los linfocitos T se describe en algunos aspectos como mediada por dos clases de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y las que actúan de forma independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). En algunos aspectos, el CAR incluye uno o ambos de dichos componentes de señalización.

El receptor, por ejemplo, el CAR, generalmente incluye al menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunos aspectos, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación inmunorreceptores basados en tirosina o ITAM. Ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen las derivadas de la cadena zeta de CD3, gamma de FcR, gamma de CD3, CD3 delta y CD3 épsilon. En algunos casos, la(s) molécula(s) de señalización citoplasmática en el CAR contiene(n) un dominio de señalización citoplasmática, una porción del mismo o una secuencia procedente de CD3 zeta.

En algunos casos, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo de TCR, tal como una cadena CD3 de TCR que media la activación y citotoxicidad de los linfocitos T, por ejemplo, la cadena zeta de CD3. Por lo tanto, en algunos aspectos, la porción de unión a antígeno se une a uno o más módulos de señalización celular. En algunos casos, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana de CD3, los dominios de señalización intracelular de CD3 y/u otros dominios transmembrana de CD. En algunos casos, el receptor, por ejemplo, CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales tales como el receptor γ de Fc, CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos aspectos, el CAR u otro receptor quimérico incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) o el receptor Fc γ y CD8, CD4, CD25 o CD16.

- En algunos casos, tras la ligación del CAR u otro receptor quimérico, el dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular del receptor activa al menos una de las funciones efectoras normales o respuestas de la célula inmunitaria, por ejemplo, un linfocito T modificado por ingeniería para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de un linfocito T, tal como la actividad citolítica o la actividad de los linfocitos T colaboradores, tal como la secreción de citocinas u otros factores. En algunos casos, se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente del receptor de antígenos o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora inalterada, por ejemplo, si transduce la señal de función efectora. En algunos casos, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de linfocitos T (TCR) y, en algunos aspectos, también las de los correceptores que, en el contexto natural, actúan en concierto con dichos receptores para iniciar la transducción de señales después de la participación del receptor de antígenos, y/o cualquier derivado o variante de dichas moléculas, y/o cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.
- En el contexto de un TCR natural, la activación total generalmente requiere no sólo la señalización a través del TCR, sino también una señal coestimuladora. Por lo tanto, en algunos casos, para promover una activación completa, también se incluye en el CAR un componente para generar una señal secundaria o coestimuladora. En otros casos, el CAR no incluye un componente para generar una señal coestimuladora. En algunos aspectos, un CAR adicional se expresa en la misma célula y proporciona el componente para generar la señal secundaria o coestimuladora.
- La activación de los linfocitos T se describe en algunos aspectos como mediada por dos clases de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y las que actúan de forma independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). En algunos aspectos, el CAR incluye uno o ambos de dichos componentes de señalización.
- En algunos casos, el receptor quimérico para el antígeno contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T. En algunos casos, el CAR incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor coestimulador, tal como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunos aspectos, el mismo CAR incluye tanto el componente activador como el coestimulador. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular derivado de una molécula coestimuladora de linfocitos T o una variante funcional de la misma, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 41BB.
- En algunos casos, el dominio de activación está incluido dentro de un CAR, mientras que el componente coestimulador lo proporciona otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunos casos, los CAR incluyen CAR activadores o estimuladores, CAR coestimuladores, ambos expresados en la misma célula (véase el documento WO2014/055668). En algunos aspectos, las células incluyen uno o más CAR estimuladores o activadores y/o un CAR coestimulador. En algunos casos, las células incluyen además CAR inhibidores (iCAR, véase Fedorov *et al.*, Sci. Transl. Medicine, 5(215) (diciembre de 2013), tal como un CAR que reconoce un antígeno distinto del asociado y/o específico de la enfermedad o afección, en donde una señal activadora emitida a través del CAR dirigido a la enfermedad se ve disminuida o inhibida por la unión del CAR inhibidor a su ligando, por ejemplo, para reducir los efectos inespecíficos.
- En determinados casos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana de CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular de CD3 (por ejemplo, CD3-zeta). En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores CD28 y CD137 (4-1BB, TNFRSF9) quiméricos, unidos a un dominio intracelular CD3 zeta.
- En algunos casos, el CAR abarca uno o más, por ejemplo, dos o más, dominios coestimuladores y un dominio de activación, por ejemplo, un dominio de activación primario, en la porción citoplásmica. Los CAR ilustrativos incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.
- En algunos casos, el receptor de antígeno incluye además un marcador y/o las células que expresan el CAR u otro receptor de antígeno incluyen además un marcador indirecto, tal como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o la modificación genética de la célula para expresar el receptor. En algunos aspectos, el marcador incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un NGFR, o receptor de factor de crecimiento epidérmico, tal como la versión truncada de dicho receptor de superficie celular (por ejemplo, tEGFR). En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el marcador está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible, por ejemplo, T2A. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente, una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera de los desvelados en la solicitud de patente publicada N.º WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR), es decir, opcionalmente, unido a una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible T2A. En unos casos, el tEGFR contiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 155 o 156. En algunos casos, el tEGFR contiene una secuencia de aminoácidos con o con aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más del 99 % de identidad de secuencia con las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 155 o 156.

En algunos casos, el marcador es una molécula, por ejemplo, una proteína de la superficie celular, que no se encuentra naturalmente en los linfocitos T o no se encuentra naturalmente en la superficie de los linfocitos T, o una porción de los mismos. En algunos casos, la molécula es una molécula no propia, por ejemplo, una proteína no propia, es decir, una que no es reconocida como "propia" por el sistema inmunitario del hospedador al que se transferirán las células adoptivamente.

En algunos casos, el marcador no tiene ninguna función terapéutica y/o no produce ningún efecto que no sea el de ser utilizado como marcador para la modificación genética, por ejemplo, para seleccionar células modificadas por ingeniería satisfactoriamente. En otros casos, el marcador puede ser una molécula terapéutica o una molécula que de otro modo ejerza algún efecto deseado, tal como un ligando para encontrar una célula *in vivo*, tal como una molécula de punto de control coestimuladora o inmune para mejorar y/o atenuar las respuestas de las células tras la transferencia adoptiva y el encuentro con el ligando.

En algunos casos, los CAR se denominan CAR de primera, segunda y/o tercera generación. En algunos aspectos, un CAR de primera generación es uno que proporciona únicamente una señal inducida por la cadena CD3 tras la unión del antígeno; en algunos aspectos, un CAR de segunda generación es aquel que proporciona dicha señal y señal coestimuladora, tal como uno que incluye un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador tal como CD28 o CD137; en algunos aspectos, un CAR de tercera generación es uno que incluye múltiples dominios coestimuladores de diferentes receptores coestimuladores.

En algunos casos, el receptor quimérico para el antígeno incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el receptor quimérico para el antígeno incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv o un anticuerpo de un solo dominio V_H y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3ζ). En algunos casos, el receptor quimérico para el antígeno incluye un dominio transmembrana dispuesto entre el dominio extracelular y la región de señalización intracelular.

En algunos aspectos, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28. El dominio extracelular y el transmembrana pueden unirse directa o indirectamente. En algunos casos, el dominio extracelular y el transmembrana están unidos por un espaciador, tal como cualquiera descrito en el presente documento. En algunos casos, el receptor quimérico para el antígeno contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 4-1BB.

Por ejemplo, en algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de CD28 o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de 4-1BB o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos de dichos casos, el receptor incluye además un espaciador que contiene una porción de una molécula de Ig, tal como una molécula de Ig humana, tal como una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, tal como un espaciador solo de bisagra.

En algunos casos, el dominio transmembrana del receptor, por ejemplo, el CAR es un dominio transmembrana de CD28 humano o una variante del mismo, por ejemplo, un dominio transmembrana de 27 aminoácidos de un CD28 humano (N.º de registro: P10747.1), o es un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 157 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 157; en algunos casos, la porción que contiene el dominio transmembrana del receptor recombinante comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 158 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos o aproximadamente un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la misma.

En algunos casos, el receptor quimérico para el antígeno contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 4-1BB.

En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de CD28 humano o una variante funcional o parte del mismo, tal como un dominio de 41 aminoácidos del mismo y/o tal dominio con una sustitución de LL a GG en las posiciones 186-187 de una proteína CD28 natural. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular puede comprender la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 159 u 160 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la misma.

90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 159 o 160. En algunos casos, la región intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de 4-1BB o una variante funcional o parte del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 42 aminoácidos de un 4-1BB humano (n.º de registro Q07011.1) o una variante funcional o una parte del mismo, tal como la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 161 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 161.

En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende una cadena CD3 humana, opcionalmente un dominio de señalización estimulador de CD3 zeta o una variante funcional del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (n.º de registro: P20963.2) o un dominio de señalización CD3 zeta tal como se describe en la Patente de EE. UU. N.º: 7.446.190 o la patente de Estados Unidos N.º 8.911.993. En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 162, 163 o 164 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 162, 163 o 164.

En algunos aspectos, el espaciador contiene solo una región de bisagra de una IgG, tal como solo una bisagra de IgG4 o IgG1, tal como solo el espaciador de bisagra establecido en la SEQ ID NO: 150. En otros casos, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, y bisagra de IgG4, unido a los dominios C_{H2} y/o C_{H3}. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida a los dominios C_{H2} y C_{H3}, tal como se establece en la SEQ ID NO: 152. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unido únicamente a un dominio C_{H3}, tal como se establece en la SEQ ID NO: 153. En algunos casos, el espaciador es o comprende una secuencia rica en glicina-serina u otro enlazador flexible tal como los enlazadores flexibles conocidos.

Por ejemplo, en algunos casos, el CAR incluye un anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo, incluidos los scFv, un espaciador, tal como un espaciador que contiene una parte de una molécula de inmunoglobulina, tal como una región de bisagra y/o una o más regiones constantes de una molécula de cadena pesada, tal como un espaciador que contiene una bisagra de Ig, un dominio transmembrana que contiene todo o parte de un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de CD28 y un dominio de señalización zeta de CD3. En algunos casos, el CAR incluye un anticuerpo o fragmento, tal como scFv, un espaciador tal como cualquiera de los espaciadores que contienen una bisagra de Ig, un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de 4-1BB, y un dominio de señalización derivado de CD3 zeta.

En algunos casos, las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas construcciones CAR incluyen además una secuencia que codifica un elemento de salto ribosómico T2A y/o una secuencia tEGFR, por ejemplo, en dirección 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. En algunos casos, también pueden generarse linfocitos T que expresen un receptor de antígeno (por ejemplo, CAR) para expresar un EGFR truncado (EGFRt) como epítipo de selección no inmunogénico (por ejemplo, mediante la introducción de una construcción que codifique el CAR y el EGFRt separados por un interruptor ribosómico T2A para expresar dos proteínas de la misma construcción), que puede utilizarse como marcador para detectar dichas células (véase, por ejemplo, la patente US-8.802.374). En algunos casos, un único promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contiene, en un solo marco abierto de lectura (ORF), dos o tres genes (por ejemplo, que codifican la molécula implicada en la modulación de una vía metabólica y que codifican el receptor recombinante) separados entre sí por secuencias que codifican un péptido de autoescisión (por ejemplo, secuencias 2A) o un sitio de reconocimiento de proteasa (por ejemplo, furina). Por tanto, el ORF codifica un único polipéptido, que, ya sea durante (en el caso de 2A) o después de la traducción, se procesa en proteínas individuales. En algunos casos, el péptido, tal como el documento T2A, puede hacer que el ribosoma se salte (salto ribosómico) la síntesis de un enlace peptídico en el extremo C de un elemento 2A, lo que conduce a la separación entre el extremo de la secuencia 2A y el siguiente péptido posterior (véase, por ejemplo, de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) y de Felipe *et al.* *Traffic* 5:616-626 (2004)). Se conocen muchos elementos 2A en la técnica. Ejemplos de secuencias 2A que pueden utilizarse en los métodos y ácidos nucleicos divulgados en el presente documento, sin limitación, las secuencias 2A del virus de la fiebre aftosa (F2A, por ejemplo, la SEQ ID NO: 131), virus de la rinitis equina A (E2A, por ejemplo, la SEQ ID NO: 130), virus Thossea asigna (T2A, por ejemplo, las SEQ ID NO: 126 o 127), y teschovirus porcino 1 (P2A, por ejemplo, las SEQ ID NO: 128 o 129) como se describe en la publicación de patente de EE.UU. n.º 20070116690.

Los receptores recombinantes, tales como los CAR, expresados por las células administradas al sujeto generalmente reconocen o se unen específicamente a una molécula que se expresa en, se asocia con y/o es específica de la enfermedad o afección o células de la misma que se están tratando. Tras la unión específica a la molécula, por ejemplo, antígeno, el receptor emite generalmente una señal inmunoestimuladora, tal como una señal inducida por ITAM, en la célula, promoviendo así una respuesta inmunitaria dirigida a la enfermedad o afección. Por ejemplo, en algunos casos, las células expresan un CAR que se une específicamente a un antígeno expresado por una célula o tejido de la enfermedad o afección o asociado a la enfermedad o afección. El receptor puede ser otro receptor, como un receptor promotor de señales inmunoinhibitorio o coestimulador, tal como un CCR o iCAR o un receptor no señalizador, por ejemplo, para su uso en la depleción o eliminación de células mediante el uso de anticuerpos.

B. Células modificadas genéticamente y métodos de producción de células

Entre las células que expresan los receptores de antígenos quiméricos se encuentran las células modificadas genéticamente. La modificación genética generalmente implica la introducción de un ácido nucleico que codifica el componente recombinante modificado genéticamente en una composición que contiene las células, tal como por transducción retroviral, transfección o transformación. Diversos métodos para la introducción de componentes transgénicos, por ejemplo, receptores recombinantes, por ejemplo, CAR, son bien conocidos y pueden utilizarse. Como métodos ilustrativos se incluyen los de la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluyendo la vía viral, por ejemplo, retrovíricos o lentivíricos, transducción, transposones y electroporación.

1. Vectores y métodos para la modificación por ingeniería genética

También se divulgan uno o más polinucleótidos (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico) que codifican receptores de antígenos quiméricos (CAR), vectores para modificar genéticamente células que expresan dichos CAR y métodos para producir las células modificadas. En algunos casos, el vector contiene el ácido nucleico que codifica el CAR. En algunos casos, el vector es un vector vírico, tal como un vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral o un vector gammaretroviral.

En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células utilizando partículas víricas infecciosas recombinantes, tales como, por ejemplo, vectores obtenidos del virus del simio 40 (SV40), adenovirus, virus adenoasociado (AAV). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T utilizando vectores lentivíricos o vectores retrovíricos recombinantes, tales como vectores gammaretrovíricos (véase, por ejemplo, Koste *et al.* (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens *et al.* (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino *et al.* (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park *et al.*, *Trends Biotechnol.* 29 de noviembre de 2011 (11): 550-557.

En algunos casos, el vector retroviral tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR), por ejemplo, un vector retroviral obtenido del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), el virus de células madre embrionarias murinas (MESV), el virus de células madre murinas (MSCV), el virus formador de focos del bazo (SFFV) o el virus adenoasociado (AAV). La mayoría de los vectores retrovíricos se obtienen de retrovirus murinos. En algunos casos, los retrovirus incluyen los procedentes de cualquier fuente de células de aves o mamíferos. Los retrovirus normalmente son anfotrópicos, lo que significa que son capaces de infectar células hospedadoras de varias especies, incluyendo seres humanos. En un caso, el gen que se va a expresar sustituye el hueco retroviral, las secuencias pol y/o env. Se han descrito varios sistemas retrovíricos ilustrativos (por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7: 980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1: 5-14; Scarpa *et al.* (1991) *Virology* 180: 849-852; Burns *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033-8037; y Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3: 102-109.

Se conocen métodos de transducción lentiviral. Se describen métodos de ejemplo en, por ejemplo, Wang *et al.* (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper *et al.* (2003) *Blood*. 101: 1637-1644; Verhoeven *et al.* (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; y Cavalieri *et al.* (2003) *Blood*. 102(2): 497-505.

En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T mediante electroporación (véase, por ejemplo, Chicaybam *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 y Van Tedeloo *et al.* (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T mediante transposición (véase, por ejemplo, Manuri *et al.* (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma *et al.* (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; y Huang *et al.* (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Otros métodos de introducción y expresión de material genético en células inmunitarias incluyen la transfección con fosfato de calcio (por ejemplo, como se describe en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.), fusión de protoplastos, transfección mediada por liposomas catiónicos; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de wolframio (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio (Brash *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

Otros enfoques y vectores para la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican los productos recombinantes son los descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional, N.º de publicación: WO2014055668 y la Patente de Estados Unidos N.º 7.446.190.

En algunos casos, las células, por ejemplo, linfocitos T, pueden transfectarse durante o después de la ampliación, por ejemplo, con un receptor de linfocitos T (TCR) o un receptor quimérico para el antígeno (CAR). Esta transfección para la introducción del gen del receptor deseado puede realizarse con cualquier vector retroviral adecuado, por ejemplo. La población de células modificadas genéticamente puede entonces liberarse del estímulo inicial (el estímulo anti-CD3/anti-CD28, por ejemplo) y posteriormente ser estimulada con un segundo tipo de estímulo (por ejemplo, a través de un receptor introducido de novo). Este segundo tipo de estímulo puede incluir un estímulo antigénico en forma de molécula de péptido/MHC, el ligando afín (entrecruzado) del receptor introducido genéticamente (por ejemplo, el ligando natural de un CAR) o cualquier ligando (tal como un anticuerpo) que se una directamente dentro del marco del

nuevo receptor (por ejemplo, mediante el reconocimiento de regiones constantes dentro del receptor). Véase, por ejemplo, Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907: 645-66 o Barrett *et al.*, Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer *Annual Review of Medicine* Vol. 65: 333-347 (2014). En algunos casos, las células se estimulan con un anticuerpo antiidiotipo divulgado de acuerdo con los métodos divulgados.

En algunos casos, puede utilizarse un vector que no requiera que las células, por ejemplo, linfocitos T, se activen. En algunos de dichos casos, las células pueden seleccionarse y/o transducirse antes de la activación. Por lo tanto, las células pueden genomodificarse antes o después del cultivo de las células y, en algunos casos, al mismo tiempo o durante al menos una parte del cultivo.

Entre los ácidos nucleicos adicionales, por ejemplo, son genes para la introducción aquellos que mejoran la eficacia de la terapia, tal como promoviendo la viabilidad y/o función de las células transferidas; genes para proporcionar un marcador genético para la selección y/o evaluación de las células, tales como para evaluar la supervivencia o localización *in vivo*; genes para mejorar la seguridad, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible a la selección negativa *in vivo* tal como lo describe Lupton S. D. *et al.*, *Mol. and Cell Biol.*, 11: 6 (1991); y Riddell *et al.*, *Human Gene Therapy* 3: 319-338 (1992); véanse también las publicaciones PCT/US91/08442 y PCT/US94/05601 de Lupton *et al.* que describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales obtenidos de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Véase, por ejemplo, Riddell *et al.*, la patente de Estados Unidos N.º 6.040.177, en las columnas 14-17.

2. Células y preparación de células para ingeniería genética

En el presente documento se divulgan células, incluidas células diseñadas que contienen un receptor de antígeno quimérico (CAR). También se divulgan poblaciones de dichas células y composiciones que contienen dichas células. Entre las composiciones se encuentran composiciones de entrada que contienen células en las que se sabe o es probable que una o más células expresen un receptor recombinante capaz de ser reconocido o unido por una molécula de unión presente en una o más partículas con las que se incuban o entran en contacto las células. También entre las composiciones se encuentran composiciones producidas por los métodos divulgados, incluyendo composiciones de salida en las que se encuentran contenidas células estimuladas o expandidas, incluyendo composiciones enriquecidas para células que contienen un receptor recombinante unido o reconocido por la molécula de unión de la partícula, tales como en el que las células que expresan el receptor recombinante, por ejemplo, un receptor quimérico, constituyen al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento o más del total de células en la composición o células de un determinado tipo, tal como linfocitos T o linfocitos CD8+ o CD4+. Por lo tanto, se desvelan células genomodificadas que expresan los receptores recombinantes, por ejemplo, los CAR.

Entre las composiciones se encuentran composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración, tal como para la terapia celular adoptiva. También se desvelan métodos para genomodificar, producir o generar dichas células, métodos terapéuticos para administrar las células y composiciones a sujetos, por ejemplo, pacientes y métodos para detectar, seleccionar, aislar o separar dichas células.

En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como una obtenida de otro organismo o célula, que, por ejemplo, normalmente no se encuentra en la célula que se está modificando por ingeniería y/o en un organismo del que se obtiene dicha célula. En algunos casos, los ácidos nucleicos no son de origen natural, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluyendo uno que comprende combinaciones químicas de ácidos nucleicos que codifican diversos dominios de múltiples tipos de células diferentes.

Las células generalmente son células eucariotas, tales como células de mamífero y normalmente son células humanas. En algunos casos, las células se obtienen de la sangre, médula ósea, linfa u órganos linfoides, son células del sistema inmunitario, tales como células del sistema inmunitario innato o adaptativo, por ejemplo, células mieloides o linfoides, incluyendo linfocitos, normalmente linfocitos T y/o linfocitos citolíticos naturales. Otras células de ejemplo incluyen células madre, tales como las células madre multipotentes y pluripotentes, incluidas las células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

Las células normalmente son células primarias, tales como las aisladas directamente de un sujeto y/o las aisladas de un sujeto y congeladas. En algunos casos, las células incluyen uno o más subconjuntos de linfocitos T u otros tipos de células, tales como poblaciones de linfocitos T completas, células CD4+, células CD8+ y subpoblaciones de las mismas, tales como aquellas definidas por su función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, expansión, recirculación, ubicación y/o capacidad de persistencia, especificidad antigénica, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, perfil de marcadores o secreción de citocinas y/o grado de diferenciación. Con referencia al sujeto que ha de tratarse, las células pueden ser alogenas y/o autólogas. Entre los métodos se incluyen métodos existentes. En algunos aspectos, como para tecnologías existentes, las células son pluripotentes y/o multipotentes, tales como células madre, tales como las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En algunos casos, los métodos incluyen aislar células del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o diseñarlas y reintroducirlas en el mismo sujeto, antes o después de su crioconservación.

Entre los subtipos y subpoblaciones de linfocitos T y/o de linfocitos T CD4+ y/o de T CD8+ están los linfocitos T indiferenciados (T_N), linfocitos T efectores (T_{EFF}), linfocitos T de memoria y subtipos de los mismos, tales como linfocitos T madre de memoria (T_{SCM}), T de memoria central (T_{CM}), T de memoria efectores (T_{EM}), o linfocitos T
 5 efectores de memoria diferenciados terminalmente, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T colaboradores, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T invariantes asociados a mucosas (MAIT), linfocitos T reguladores (Treg) adaptativos y de origen natural, linfocitos T colaboradores, tales como linfocitos TH1, linfocitos TH2, linfocitos TH3, linfocitos TH17, linfocitos TH9, linfocitos TH22, linfocitos T colaboradores
 10 foliculares, linfocitos T alfa/beta y linfocitos T delta/gamma.

En algunos casos, las células son linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunos casos, las células son monocitos o
 15 granulocitos, por ejemplo, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y/o basófilos.

En algunos casos, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante genomodificación, y de ese
 20 modo expresan productos recombinantes o genomodificados de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como una obtenida de otro organismo o célula, que, por ejemplo, normalmente no se encuentra en la célula que se está modificando por ingeniería y/o en un organismo del que se obtiene dicha célula. En algunos casos, los ácidos
 25 nucleicos no son de origen natural, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluyendo uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican diversos dominios de múltiples tipos de células diferentes.

En algunos casos, la preparación de las células modificadas por ingeniería incluye una o más etapas de cultivo y/o
 30 preparación. Las células para la introducción del ácido nucleico que codifica el receptor transgénico como el CAR, se pueden aislar de una muestra, tal como una muestra biológica, por ejemplo, una obtenida o derivada de un sujeto. En algunos casos, el sujeto del que se aísla la célula es uno que tiene la enfermedad o afección o que necesita una terapia celular o al que se le administrará la terapia celular. En algunos casos, el sujeto es un ser humano que necesita una intervención terapéutica particular, tal como la terapia celular adoptiva para la que se aíslan células, se procesan
 35 y/o se modifican por ingeniería.

En consecuencia, en algunos casos, las células son células primarias, por ejemplo, células primarias humanas. Las
 40 muestras incluyen tejido, fluido y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así como muestras resultantes de una o más etapas de procesamiento, tales como separación, centrifugación, modificación por ingeniería genética (por ejemplo, transducción con vector vírico), el lavado y/o la incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Las muestras biológicas incluyen, pero
 45 no se limitan a, líquidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluyendo muestras procesadas obtenidas de los mismos.

En algunos aspectos, la muestra de la que se obtienen o aíslan las células es sangre o una muestra derivada de la
 50 sangre, o es o se obtiene de un producto de aféresis o leucocitaféresis. Las muestras de ejemplo incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfóide asociado al intestino, tejido linfóide asociado a mucosas, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino,
 45 testículos, ovarios, amígdalas u otro órgano, y/o células derivadas de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, por ejemplo, terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénas.

En algunos casos, las células proceden de estirpes celulares, por ejemplo, estirpes de linfocitos T. En algunos casos,
 55 las células se obtienen de una fuente xenógena, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano y cerdo.

En algunos casos, el aislamiento de las células incluye una o más etapas de preparación y/o separación de células no
 60 basada en afinidad. En algunos ejemplos, las células se lavan, se centrifugan y/o se incuban en presencia de uno o más reactivos, por ejemplo, para eliminar componentes no deseados, enriquecer en componentes deseados, causar la lisis celular o eliminar las células sensibles a reactivos particulares. En algunos ejemplos, las células se separan basándose en una o más propiedades, tales como densidad, propiedades adherentes, tamaño, sensibilidad y/o
 55 resistencia a componentes particulares.

En algunos ejemplos, se obtienen células de la sangre en circulación de un sujeto, por ejemplo, mediante aféresis o
 60 leucocitaféresis. Las muestras, en algunos aspectos, contienen linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y en algunos aspectos contiene células distintas de los glóbulos rojos y las plaquetas. En algunos casos, antes de la selección y/o enriquecimiento de células, la muestra o las células de la muestra se pueden dejar reposar o retener antes de las etapas de procesamiento posteriores. En algunos casos, la muestra se mantiene o se conserva a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 48 horas, tal como durante hasta 12 horas, 24 horas o 36 horas. En
 65 determinados casos, las células no se seleccionan y/o enriquecen antes de ponerlas en contacto con el uno o más ácidos nucleicos. En algunos casos, la muestra o las células se pueden dejar reposar o retener antes de ponerlas en

contacto o incubarlas con uno o más ácidos nucleicos. En determinados casos, la muestra se mantiene o se conserva a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 48 horas, tal como durante hasta 12 horas, 24 horas o 36 horas antes de poner en contacto o incubar las células con uno o más ácidos nucleicos.

5 En algunos casos, las células sanguíneas recogidas del sujeto se lavan, por ejemplo, para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio adecuado para las etapas de procesamiento posteriores. En algunos casos, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunos casos, la solución de lavado carece de calcio y/o magnesio y/o de muchos o de todos los cationes divalentes. En algunos aspectos, una etapa de lavado se lleva a cabo en una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, Baxter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos aspectos, una etapa de lavado se logra mediante filtración de flujo tangencial (TFF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, las células se resuspenden en una diversidad de tampones biocompatibles después del lavado, tales como, por ejemplo, PBS sin $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. En determinados casos, los componentes de una muestra de células sanguíneas se eliminan y las células se resuspenden directamente en el medio de cultivo.

15 En algunos casos, los métodos incluyen métodos de separación celular basados en densidad, tales como la preparación de glóbulos blancos a partir de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y la centrifugación a través de un gradiente de Percoll o Ficoll.

20 En algunos casos, los métodos de aislamiento incluyen la separación de tipos celulares diferentes basándose en la expresión o en la presencia en la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, por ejemplo, proteínas de superficie, marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunos casos, para la separación puede usarse cualquier método conocido basándose en dichos marcadores. En algunos casos, la separación es una separación basada en afinidad o inmutafinidad. Por ejemplo, en algunos aspectos, el aislamiento incluye la separación de células y poblaciones de células en función de la expresión de las células o del nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o compañero de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguido generalmente de etapas de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o al compañero de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión.

30 Dichas etapas de separación pueden basarse en selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos quedan retenidas para su uso posterior, y/o en selección negativa, en la que las células que no se han unido al anticuerpo o compañero de unión se conservan. En algunos ejemplos, ambas fracciones se conservan para su uso posterior. En algunos aspectos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay ningún anticuerpo disponible que identifique específicamente un tipo de célula en una población heterogénea, de manera que la separación se realiza mejor basándose en marcadores expresados por células distintas de la población deseada.

35 No es necesario que la separación dé como resultado un enriquecimiento del 100 % o la eliminación de una población celular particular o células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refieren al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente da como resultado una ausencia total de células que no expresan el marcador. Análogamente, la selección negativa, la eliminación o el agotamiento de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refieren a disminuir el número o porcentaje de dichas células, pero no tiene por qué como resultado a una eliminación completa de todas esas células.

45 En algunos ejemplos, se realizan múltiples rondas de etapas de separación, donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de una etapa se somete a otra etapa de separación, tal como una selección posterior positiva o negativa. En algunos ejemplos, una única etapa de separación puede agotar células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, tal como incubando las células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión, cada uno de ellos específico para un marcador dirigido a la selección negativa. Análogamente, pueden seleccionarse simultáneamente múltiples tipos celulares positivamente incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión expresados en los diversos tipos celulares.

50 Por ejemplo, en algunos aspectos, subpoblaciones específicas de linfocitos T, tal como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, por ejemplo, CD28^+ , CD62L^+ , CCR7^+ , CD27^+ , CD127^+ , CD4^+ , CD8^+ , linfocitos T CD45RA^+ y/o CD45RO^+ , se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa.

60 Por ejemplo, CD3^+ , los linfocitos T CD28^+ pueden seleccionarse positivamente usando perlas magnéticas conjugadas CD3/CD28 (por ejemplo, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander). En casos particulares, las células se ponen en contacto con perlas magnéticas conjugadas anti- CD3/anti-CD28 (por ejemplo, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander) para expandir los linfocitos T CD3^+ , CD28^+ antes de poner en contacto las células con uno o más ácidos nucleicos. En determinados casos, las células no entran en contacto con perlas magnéticas conjugadas anti- CD3/anti-CD28 antes de poner en contacto las células con uno o más ácidos nucleicos.

65 En algunos casos, el aislamiento se realiza mediante el enriquecimiento en una población celular particular mediante selección positiva, o el agotamiento de una población celular particular, mediante selección negativa. En algunos

casos, la selección positiva o negativa se logra incubando células con uno o más anticuerpos u otro agente de unión que se une específicamente a uno o más marcadores de superficie expresados o expresados (marcador⁺) a un nivel relativamente más alto (marcador^{alto}) en las células seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente.

- 5 En algunos casos, los linfocitos T se separan de una muestra de PBMC mediante la selección negativa de marcadores expresados en células que no son linfocitos T, tales como linfocitos B, monocitos u otros glóbulos blancos, tal como CD14. En algunos aspectos, se usa una etapa de selección CD4⁺ o CD8⁺ para separar linfocitos T CD4⁺ colaboradores y linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Tales poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ se pueden clasificar a su vez en subpoblaciones mediante la selección positiva o negativa de los marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de linfocitos T indiferenciados, de memoria, y/o efectores.

En algunos casos, los linfocitos CD8⁺ se enriquecen aún más o se reducen las células indiferenciadas, de memoria central, memoria efectora, y/o células madre de memoria central, tal como mediante selección positiva o negativa basándose en antígenos de superficie asociados a la subpoblación respectiva. En algunos casos, el enriquecimiento para los linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se lleva a cabo para aumentar la eficacia, tal como para mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto después de la administración, que en algunos aspectos es particularmente sólido en dichas subpoblaciones. Véase Terakura *et al.* (2012) Blood.1:72-82; Wang *et al.* (2012) J Immunother. 35(9): 689-701. En algunos casos, la combinación de linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺ enriquecidos en T_{CM} mejora adicionalmente su eficacia.

En unos casos, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻ de linfocitos CD8⁺ de sangre periférica. Las PBMC se pueden enriquecer o empobrecerse en las fracciones CD62L⁻CD8⁺ y/o CD62L⁺CD8⁺, tales como el uso de anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L.

En algunos casos, el enriquecimiento de los linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se basa en una expresión de superficie alta o positiva de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD 127; en algunos aspectos, se basa en la selección negativa de células que expresan o expresan mucho CD45RA y/o granzima B. En algunos aspectos, aislamiento de una población CD8⁺ enriquecida para células T_{CM} se lleva a cabo mediante el agotamiento de las células que expresan CD4, CD14, CD45RA y la selección positiva o el enriquecimiento en células que expresan CD62L. En un aspecto, el enriquecimiento para los linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se lleva a cabo a partir de una fracción negativa de células seleccionadas en función de la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA, y una selección positiva basada en CD62L. En algunos aspectos, dichas selecciones se realizan de forma simultánea y en otros aspectos de forma secuencial, en cualquier orden. En algunos aspectos, la misma etapa de selección basada en la expresión de CD4 utilizada en la preparación de la población o subpoblación de células CD8⁺, también se usa para generar la población o subpoblación de células CD4⁺, de manera que tanto las fracciones positivas como las negativas de la separación basada en CD4 se conserven y usen en las etapas de los métodos posteriores, opcionalmente después de una o más etapas de selección positiva o negativa adicionales.

En un ejemplo particular, una muestra de PBMC u otra muestra de glóbulos blancos se somete a selección de células CD4⁺, donde se conservan las fracciones tanto negativas como positivas. Después, la fracción negativa se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA o CD19, y a una selección positiva basada en un marcador característico de los linfocitos T de memoria central, tal como CD62L o CCR7, donde las selecciones positivas y negativas se realizan en cualquier orden.

Los linfocitos T CD4⁺ colaboradores se clasifican en células indiferenciadas, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ se pueden obtener mediante métodos convencionales. En algunos casos, los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados son linfocitos CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, linfocitos T CD4⁺. En algunos casos, los linfocitos CD4⁺ de memoria central pueden ser CD62L⁺ y CD45RO⁺. En algunos casos, los linfocitos CD4⁺ efectoras son CD62L⁻ y CD45RO⁻.

En un ejemplo, para el enriquecimiento en células CD4⁺ por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En algunos casos, el anticuerpo o compañero de unión se une a un soporte sólido o matriz, tal como una perla magnética o una perla paramagnética, para permitir la separación de células para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, en algunos casos, las células y las poblaciones de células se separan o aíslan mediante técnicas de separación inmunomagnéticas (o magnéticas por afinidad) (revisadas en Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior *In Vitro* and *In Vivo*, p 17-25 Editado por: S. A. Brooks y U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

En algunos aspectos, la muestra o composición de células que ha de separarse se incuba con material pequeño, magnetizable o magnéticamente sensible, tal como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, tales como perlas paramagnéticas (por ejemplo, perlas Dynabeads o MACS). El material magnéticamente sensible, por ejemplo, partícula, generalmente está unido directa o indirectamente a un compañero de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, por ejemplo, un marcador de superficie, presente en la célula, células o población de células que se desean separar, por ejemplo, que se desea seleccionar negativa o positivamente.

En algunos casos, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un compañero de unión específico, tal como un anticuerpo u otro compañero de unión. Existen muchos materiales magnéticamente sensibles bien conocidos que se usan en métodos de separación magnética. Las partículas magnéticas adecuadas incluyen las descritas en Molday, Patente de los EE. UU. N.º 4.452.773 y en la Memoria descriptiva de patente europea EP 452342 B. Las partículas de tamaño coloidal, tales como las descritas en la Patente de los EE. UU. N.º 4.795.698 de Owen y Liberti *et al.*, la Patente de EE.UU. 5.200.084 son otros ejemplos.

La incubación generalmente se lleva a cabo en condiciones en las que los anticuerpos o compañeros de unión, o moléculas, tales como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a dichos anticuerpos o compañeros de unión, que están adheridos a la partícula o perla magnética, específicamente se unen a las moléculas de superficie celular si están presentes en las células dentro de la muestra.

En algunos aspectos, la muestra se coloca en un campo magnético, y las células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables adheridas a las mismas serán atraídas al imán y se separarán de las células sin marcar. Para la selección positiva, quedan retenidas células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, quedan retenidas las células no atraídas (células sin marcar). En algunos aspectos, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante la misma etapa de selección, donde quedan retenidas las fracciones positivas y negativas y se procesan adicionalmente o se someten a etapas de separación adicionales.

En determinados casos, las partículas magnéticamente sensibles se recubren con anticuerpos primarios u otros compañeros de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En determinados casos, las partículas magnéticas se unen a las células a través de un recubrimiento de anticuerpos primarios específicos para uno o más marcadores. En determinados casos, las células, en lugar de las perlas, se marcan con un anticuerpo primario o un compañero de unión, y después se añaden partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo secundario específico del tipo celular u otro compañero de unión (por ejemplo, estreptavidina). En determinados casos, las partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina se usan junto con anticuerpos primarios o secundarios biotinilados.

En algunos casos, las partículas magnéticamente sensibles se dejan unidas a las células que han de incubarse posteriormente, se cultivarán y/o se modifican por ingeniería; en algunos aspectos, las partículas se dejan adheridas a las células para su administración a un paciente. En algunos casos, las partículas magnetizables o magnéticamente sensibles se eliminan de las células. Se conocen métodos para eliminar partículas magnetizables de las células e incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos no marcados competitivos y partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con enlaces escindibles. En algunos casos, las partículas magnetizables son biodegradables.

En algunos casos, la selección basada en afinidad se realiza mediante clasificación de células activadas magnéticamente (MACS, *Magnetic Activated Cell Sorting*) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Los sistemas de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) son capaces de realizar una selección de alta pureza de células que tienen partículas magnetizadas unidas a las mismas. En determinados casos, la MACS funciona en un modo en donde las especies no diana y diana específicas se eluyen de manera secuencial después de la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células adheridas a las partículas magnetizadas se mantienen en su lugar mientras eluyen las especies no adheridas. Después, tras completar esta primera etapa de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y se impidió que eluyesen, se liberan de alguna manera, de manera que puedan eluir y recuperarse. En determinados casos, las células no diana se marcan y la población heterogénea de células se agota de las mismas.

En determinados casos, el aislamiento o separación se realiza usando un sistema, dispositivo o aparato que realiza una o más de las etapas de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunos aspectos, el sistema se utiliza para realizar cada una de estas etapas en un entorno cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación y/o la contaminación por el usuario. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la Solicitud de Patente Internacional, Número de publicación WO2009/072003 o US 20110003380 A1. En un ejemplo, el sistema es un sistema como el descrito en la publicación internacional número WO2016/073602.

En algunos casos, el sistema o aparato realiza una o más, por ejemplo, la totalidad de las etapas de aislamiento, procesamiento, ingeniería y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos aspectos, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o un programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de, y/o ajustar, diversos aspectos de las etapas de procesamiento, aislamiento, modificación por ingeniería y formulación.

En algunos aspectos, la separación y/u otras etapas se realizan usando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec), por ejemplo, para la separación automática de células a nivel clínico en un sistema cerrado y aséptico. Los componentes pueden incluir un microordenador integrado, una unidad de separación magnética, una bomba peristáltica y diversas válvulas de pinza. El ordenador integrado en algunos aspectos controla todos los componentes del equipo y dirige el sistema para que realice procedimientos repetidos en una secuencia estandarizada. La unidad de separación

magnética en algunos aspectos incluye un imán permanente móvil y un soporte para la columna de selección. La bomba peristáltica controla el caudal en todo el conjunto de tubos y, junto con las válvulas de pinza, garantiza el flujo controlado de tampón a través del sistema y la suspensión continua de células.

5 En algunos aspectos, el sistema CliniMACS utiliza partículas magnetizables acopladas a anticuerpos que se suministran en una solución estéril, apirógena. En algunos casos, después del marcaje de las células con partículas magnéticas, las células se lavan para eliminar el exceso de partículas. Después se conecta una bolsa de preparación celular al conjunto de tubos, que a su vez se conecta a una bolsa que contiene tampón y una bolsa de recogida de células. El conjunto de tubos consiste en tubos asépticos pre-ensamblados, incluyendo una precolumna y una columna de separación, y son de un solo uso. Después del inicio del programa de separación, el sistema aplica automáticamente la muestra de células en la columna de separación. Las células marcadas quedan retenidas dentro de la columna, mientras que las células sin marcar se eliminan mediante una serie de etapas de lavado. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento están sin marcar y no quedan retenidas en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento están marcadas y quedan retenidas en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento se eluyen de la columna después de la eliminación del campo magnético y se recogen dentro de la bolsa de recogida de células.

20 En determinados casos, la separación y/u otras etapas se llevan a cabo utilizando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). El sistema CliniMACS Prodigy, en algunos aspectos, está equipado con una unidad de procesamiento de células que permite el lavado y el fraccionamiento automatizados de las células por centrifugación. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara integrada y un programa informático de reconocimiento de imágenes que determina el criterio de valoración de fraccionamiento celular óptimo al discernir las capas macroscópicas del producto de la célula fuente. Por ejemplo, la sangre periférica se separa automáticamente en eritrocitos, glóbulos blancos y capas de plasma. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que cumple protocolos de cultivo celular tales como, por ejemplo, diferenciación y expansión celulares, carga de antígeno y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada pueden permitir la extracción estéril y el reabastecimiento de los medios y las células pueden controlarse usando un microscopio integrado. Véase, por ejemplo, Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood*.1: 72-82 y Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 689-701.

35 En algunos casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o empobrece) mediante citometría de flujo, en la que las células teñidas con respecto a marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluidica. En algunos casos, una población de células descrita en el presente documento se recolecta y enriquece (o agota) mediante selección a escala preparativa (FACS). En determinados casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o empobrece) usando microplacas de sistemas microelectromecánicos (SMEM, *microelectromechanical systems*) junto con un sistema de detección basado en FACS (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2010/033140, Cho *et al.* (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; y Godin *et al.* (2008) *J Biophoton.* 1(5): 355-376. En ambos casos, las células pueden marcarse con múltiples marcadores, lo que permite el aislamiento de subconjuntos de linfocitos T bien definidos con alta pureza.

45 En algunos casos, los anticuerpos o compañeros de unión se marcan con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación mediante selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación puede basarse en la unión a anticuerpos marcados con fluorescencia. En algunos ejemplos, la separación de células basada en la unión de anticuerpos u otros compañeros de unión específicos para uno o más marcadores de superficie celular se realiza en una corriente fluidica, tal como por selección de células activadas por fluorescencia (FACS), incluyendo microplacas de escala preparativa (FACS) y/o sistemas microelectromecánicos (MEMS), por ejemplo, en combinación con un sistema de detección por citometría de flujo. Dichos métodos permiten la selección positiva y negativa basada en múltiples marcadores simultáneamente.

50 En algunos casos, los métodos de preparación incluyen etapas para congelar, por ejemplo, crioconservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, incubación y/o modificación por ingeniería. En algunos casos, la etapa de congelación y descongelación posterior elimina los granulocitos y, hasta cierto punto, los monocitos, en la población celular. En algunos casos, las células se suspenden en una solución de congelación, por ejemplo, después de una etapa de lavado para eliminar el plasma y las plaquetas. En algunos aspectos, puede usarse cualquiera de las diversas soluciones y parámetros de congelación conocidos. Un ejemplo implica el uso de PBS que contiene un DMSO al 20 % y seroalbúmina humana (HSA, *human serum albumin*) al 8 % u otros medios de congelación de células adecuados. Esto después se diluye a 1:1 con medio de manera que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10 % y del 4 %, respectivamente. Después, las células generalmente se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

65 En algunos casos, las células se incuban y/o cultivan antes de o en relación con la modificación por ingeniería genética. Las etapas de incubación pueden incluir cultivar, cultivo, estimulación, activación y/o propagación. La incubación y/o la modificación por genética pueden realizarse en un recipiente de cultivo, tal como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro recipiente para el cultivo o cultivar células. En algunos casos, las composiciones o células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente

estimulador. Dichas condiciones incluyen las diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para cebar las células para la modificación por ingeniería genética, tal como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante.

- 5 Las condiciones pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.
- 10 En algunos casos, las condiciones estimulantes o agentes estimuladores incluyen uno o más agentes, por ejemplo, un ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo de TCR. En algunos aspectos, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un TCR, por ejemplo, anti-CD3. En algunos casos, las condiciones estimuladores incluyen uno o más agentes, por ejemplo, un ligando, capaz de estimular a un receptor coestimulador, por ejemplo, anti-CD28. En algunos casos, dichos agentes y/o ligandos pueden estar unidos a un soporte sólido tal como una perla, y/o una o más citocinas. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anti CD28 al medio de cultivo (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). En algunos casos, los agentes estimuladores incluyen IL-2, IL-15 y/o IL-7. En algunos aspectos, la concentración de IL-2 de al menos aproximadamente 10 unidades/ml.
- 15
- 20 En algunos aspectos, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas tales como las descritas en la patente de EE.UU. N.º 6.040.1 77 de Riddell. *et al.*, Klebanoff *et al.* (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) Blood. 1: 72-82 y/o Wang *et al.* (2012) J Immunother. 35(9): 689-701.
- 25 En algunos casos, los linfocitos T se expanden añadiendo a una composición de inicio del cultivo células alimentadoras, tales como las células mononucleares de sangre periférica que no se dividen (PBMC), (por ejemplo, de manera que la población de células resultante contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras PBMC por cada linfocito T en la población inicial que se va a expandir); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para expandir el número de linfocitos T). En algunos aspectos, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras de PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunos casos, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunos aspectos, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de la adición de las poblaciones de linfocitos T.
- 30
- 35 En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos unos 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados, y generalmente en o aproximadamente 37 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además la adición de células linfoblastoides (LCL) transformadas con EBV que no se dividen como células alimentadoras. Las LCL se pueden irradiar con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras LCL en algunos aspectos se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, tal como una proporción de células alimentadoras LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.
- 40

IV. COMPOSICIONES

- 45 También se divulgan composiciones que incluyen las moléculas de unión, tales como anticuerpos, como se divulga en el presente documento, incluyendo composiciones y formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y formulaciones generalmente incluyen uno o más vehículos o excipientes opcionales aceptables.

- 50 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que sea eficaz la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

- 55 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

- 60 En algunos aspectos, la elección del vehículo se determina en parte por la célula en particular, la molécula de unión y/o el anticuerpo y/o por el método de administración. En consecuencia, existe una diversidad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos aspectos, se utiliza una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o las mezclas de los mismos están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 2 % en peso de la composición total. Los vehículos se describen, por ejemplo, por Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980). Los vehículos farmacéuticamente aceptables son, en general, no tóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de
- 65

- octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG).
- Los agentes tampón en algunos aspectos se incluyen en las composiciones. Los agentes tampón adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y diversos otros ácidos y sales. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más agentes tampón. El agente tamponante o mezclas del mismo están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 4 % en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Se describen métodos de ejemplo con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª ed. (1 de mayo de 2005).
- En algunos aspectos, la composición puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos aspectos, se utiliza una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o las mezclas de los mismos están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 2 % en peso de la composición total. Los vehículos se describen, por ejemplo, por Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980). Los vehículos aceptables incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG).
- Las formulaciones de los anticuerpos pueden incluir formulaciones liofilizadas y soluciones acuosas.
- En algunos casos, las composiciones se proporcionan como preparaciones líquidas asépticas, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que, en algunos aspectos, pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, especialmente por inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, se pueden formular dentro del intervalo de viscosidad adecuado para proporcionar períodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que pueden ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.
- Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando la molécula de unión en un disolvente, tal como en mezcla con un vehículo adecuado, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua esterilizada, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes, agentes dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponantes del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada. En algunos aspectos, se pueden consultar los textos convencionales para preparar preparaciones adecuadas.
- Pueden añadirse diversos aditivos que mejoran la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. Puede garantizarse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede realizarse usando agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes, agentes dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponantes del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, colores y similares. En algunos aspectos, se pueden consultar los textos convencionales para preparar preparaciones adecuadas.
- Las formulaciones que han de usarse para la administración *in vivo* son, en general, estériles. La esterilización puede realizarse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

V. MÉTODOS Y USOS DE LOS ANTICUERPOS

En algunos casos, en el presente documento se divulgan métodos que implican el uso de uno o más anticuerpos antiidiotipo. En algunos aspectos, en el presente documento se divulgan métodos para medir o detectar un anticuerpo diana, tal como un CAR o una célula que expresa un CAR, y métodos para modificar la actividad del anticuerpo diana, tal como la actividad de un CAR o la actividad de una célula que expresa un CAR. En determinados casos, el o los anticuerpos antiidiotipo se unen, detectan, identifican y/o cuantifican el CAR y/o las células que expresan el CAR. En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento proporcionan una o más etapas de contacto y/o incubación de uno o más anticuerpos antiidiotipo con una célula o una muestra que contiene o se cree que contiene células que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se trata, incuba y/o pone en contacto con la composición o muestra en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo antiidiotipo y el anticuerpo diana, por ejemplo, el CAR. En algunos aspectos, el complejo puede utilizarse con el fin de detectar, aislar y/o medir el CAR. En algunos casos, la formación del complejo modifica la actividad del anticuerpo diana, por ejemplo, el CAR, tal como estimulando la actividad de señalización del receptor, o en algunos casos, antagonizando la actividad del anticuerpo diana, por ejemplo, el CAR, impidiendo la asociación del CAR con un antígeno.

A. Métodos de detección/aislamiento

En algunos casos, se divulgan métodos que implican el uso de uno o más de los anticuerpos antiidiotipo y/o moléculas (tales como conjugados y complejos) que contienen uno o más de dichos anticuerpos antiidiotipo, para la detección, unión y/o aislamiento de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo diana. En determinados casos, los métodos proporcionan una o más etapas de contacto, incubación y/o exposición del uno o más anticuerpos antiidiotipo a una muestra y/o composición. En algunos casos, la muestra y/o composición tiene, es probable que tenga, y/o se sospecha que tiene, un anticuerpo diana y/o un fragmento de unión a antígeno del mismo que está unido y/o es reconocido por uno o más anticuerpos antiidiotipo. En determinados casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que está unido o es reconocido por uno o más anticuerpos antiidiotipo contiene uno o más dominios de fusión y/o es una proteína de fusión. En determinados casos, el anticuerpo diana y/o fragmento de unión a antígeno del mismo es un CAR. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo, se une y/o reconoce un anticuerpo anti-CD19 (*por ejemplo*, anticuerpo SJ25C1 o FMC63), o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo una molécula química conjugada que incluye un CAR, que contiene dicho anticuerpo anti-CD19 (*por ejemplo*, fragmento de anticuerpo).

Los métodos en algunos casos incluyen incubar, tratar y/o poner en contacto una muestra y/o una composición que contiene o se sospecha que contiene el anticuerpo diana con el anticuerpo antiidiotipo. En determinados casos, la incubación se realiza en condiciones que permiten la unión del anticuerpo antiidiotipo al anticuerpo diana presente en la composición, *por ejemplo* para formar un complejo que contenga el anticuerpo antiidiotipo y el anticuerpo diana.

En algunos casos, la muestra y/o composición contiene o se sospecha que contiene el anticuerpo diana, *por ejemplo*, un CAR. En determinados casos, la muestra y/o composición contiene o se sospecha que contiene células que expresan el anticuerpo diana, *por ejemplo*, un CAR. En determinados casos, la muestra es una muestra biológica. En casos particulares, la muestra es una muestra de suero o una muestra de sangre. En algunos casos, la muestra biológica contiene una o más células inmunitarias. En algunos casos, la muestra biológica es o se deriva de un tejido, tal como tejido conectivo, tejido muscular, tejido nervioso o tejido epitelial. En casos particulares, la muestra biológica es o deriva del corazón, vasculatura, glándulas salivales, esófago, estómago, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestinos, colon, recto, hipotálamo, glándula pituitaria, glándula pineal, tiroides, glándula paratiroidea, glándula suprarrenal, riñón, uréter, vejiga, uretra, sistema linfático, piel, músculo, cerebro, médula espinal, nervios, ovarios, útero, testículos, próstata, faringe, laringe, tráquea, bronquios, pulmones, diafragma, hueso, cartílago, ligamentos o tendones. En casos particulares, la muestra biológica se toma, recoge y/u obtiene de un sujeto humano. En determinados casos, la muestra contiene células vivas y/o intactas. En algunos casos, la muestra es o contiene un homogeneizado y/o células que han sido alteradas y/o lisadas. En algunos casos, la muestra biológica contiene proteínas y/o anticuerpos que han sido aislados de sangre, suero y/o un tejido.

En casos particulares, el anticuerpo antiidiotipo forma o es capaz de formar un complejo con un anticuerpo diana, *por ejemplo*, un CAR. En casos particulares, el complejo se detecta, mide, cuantifica y/o evalúa, *por ejemplo*, para permitir la detección, identificación, medición y/o cuantificación del anticuerpo diana, *por ejemplo* en una composición o una muestra. En determinados casos, los métodos incluyen detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo antiidiotipo y el anticuerpo objetivo en la muestra, y/o detectar la presencia o ausencia o el nivel de dicha unión. En algunos casos, el complejo contiene un marcador detectable. En casos particulares, el anticuerpo antiidiotipo es un inmunconjugado que contiene un marcador detectable. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo contiene, se conjuga con, se une a y/o se fija a, el marcador detectable. En algunos casos, el complejo contiene un anticuerpo que se une y/o reconoce el anticuerpo antiidiotipo, *por ejemplo*, un anticuerpo secundario, que se conjuga con, se une a y/o se fija a, un marcador detectable.

En algunos casos, los métodos para detectar, cuantificar, detectar y/o evaluar un anticuerpo objetivo, *por ejemplo* en una muestra o composición, incluyen la detección de un complejo del anticuerpo objetivo y el anticuerpo antiidiotipo.

En algunos casos, el complejo contiene un marcador detectable. En determinados casos, el complejo se prueba y/o se pone en contacto con un marcador detectable. En algunos casos, el complejo se detecta mediante cualquier método o medio adecuado, tal como, pero sin limitaciones, citometría de flujo, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, análisis Western blot y ELISA.

En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno está unido a una célula o se expresa en la superficie de una célula. En casos particulares, el anticuerpo diana, por ejemplo, el CAR no está ligado ni contenido dentro de una célula, por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo diana se secreta. En determinados casos, el anticuerpo se ha desprendido, eliminado y/o lisado de la superficie de una célula.

En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno está contenido en un receptor de antígeno quimérico (CAR), tal como un CAR expresado en la superficie de una célula. En algunos casos, la célula es una célula madre, por ejemplo, una iPSC o una célula inmunitaria. En algunos casos, la célula inmunitaria es un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, linfocito T indiferenciado (T_N), linfocito T efector (T_{EFF}), linfocito T de memoria, linfocito infiltrante de tumor (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TIL), linfocito T inmaduro, linfocito T maduro, linfocitos T colaboradores, linfocito T citotóxico, linfocito T invariante asociado a la mucosa (*mucosa-associated invariant T*, MAIT), linfocito T regulador (Treg) adaptativo y de origen natural, linfocito T colaborador, tal como un linfocito TH1, linfocito TH2, linfocito TH3, linfocito TH17, linfocito TH9, linfocito TH22, linfocito T colaborador folicular, linfocito T alfa/beta y/o linfocito T delta/gamma. En algunos casos, la célula es de un tejido, por ejemplo, corazón, vasculatura, glándulas salivales, esófago, estómago, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestinos, colon, recto, hipotálamo, glándula pituitaria, glándula pineal, tiroides, glándula paratiroidea, glándula suprarrenal, riñón, uréter, vejiga, uretra, sistema linfático, piel, músculo, cerebro, médula espinal, nervios, ovarios, útero, testículos, próstata, faringe, laringe, tráquea, bronquios, pulmones, diafragma, hueso, cartílago, ligamentos o tendones.

En algunos casos, el anticuerpo diana es un anticuerpo anti-CD19. En algunos casos, el anticuerpo diana es o deriva del anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana es o deriva del anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para detectar un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo (y/o moléculas quiméricas que comprenden dicho anticuerpo, por ejemplo, fragmento de anticuerpo, tal como un CAR), que comprende poner en contacto una composición que comprende el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo o un inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo descrito en este documento, y detectar el anticuerpo antiidiotipo unido al anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno. En algunos casos, el método incluye además detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo antiidiotipo y el anticuerpo diana en la composición, tal como detectar la presencia o ausencia o el nivel de dicha unión. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno está unido a una célula o se expresa en la superficie de una célula y la detección comprende la detección de células unidas con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado directa o indirectamente para su detección. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para el aislamiento de un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo (y/o moléculas quiméricas que comprenden dicho anticuerpo, por ejemplo, fragmento de anticuerpo, tal como un CAR), que comprende poner en contacto una composición y/o una muestra que contiene o se sospecha que contiene el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno con un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo descrito en el presente documento, y aislar complejos que comprenden el anticuerpo antiidiotipo unido al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno. En determinados casos, el anticuerpo diana se aísla con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un inmunoconjugado, tal como un inmunoconjugado descrito en la Sección I-F. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno está unido a una célula o se expresa en la superficie de una célula y el aislamiento comprende el aislamiento de células unidas con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, los complejos que comprenden el anticuerpo antiidiotipo se aíslan mediante separación basada en afinidad. En algunos casos, la separación basada en afinidad se selecciona del grupo que consiste en la separación basada en inmunoafinidad, separación basada en magnetismo y cromatografía de afinidad. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para detectar una célula que expresa un CAR que comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende poner en contacto la célula que expresa el CAR con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo o un inmunocombinado de anticuerpo antiidiotipo descrito en el presente documento, y detectar células unidas con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado directa o indirectamente para su detección. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En determinados casos, los métodos para detectar un anticuerpo diana con un anticuerpo antiidiotipo descritos en este documento se utilizan para evaluar el anticuerpo diana en un sujeto. Por ejemplo, en algunos casos, en el presente documento se divulgan métodos de uso del anticuerpo antiidiotipo para evaluar, medir y/o cuantificar la farmacocinética *in vivo*, expansión y/o persistencia de células que expresan CAR de una composición celular terapéutica. En algunos casos, la farmacocinética *in vivo*, expansión y/o persistencia de las células, y/o cambios en los fenotipos celulares o la actividad funcional de las células, tal como las células que expresan CAR administradas para inmunoterapia, por ejemplo, terapia con linfocitos T-CAR, en los métodos divulgados en el presente documento, puede medirse con los anticuerpos antiidiotipo divulgados en el presente documento. En algunos casos, la farmacocinética, expansión y/o persistencia de las células que expresan CAR se miden, evalúan mediante la detección de la presencia y/o cantidad de células que expresan el CAR en el sujeto y/o en la muestra obtenida del sujeto después de la administración de la composición celular terapéutica durante y/o después de la administración de la terapia con un anticuerpo antiidiotipo divulgado en el presente documento.

En algunos aspectos, el anticuerpo antiidiotipo se utiliza con citometría de flujo para evaluar la cantidad de células que expresan el receptor recombinante (por ejemplo, células que expresan CAR administradas para terapia basada en linfocitos T) en la sangre, suero, órgano o muestra de tejido (por ejemplo, sitio de la enfermedad, por ejemplo, muestra de tumor) del sujeto. En algunos aspectos, la persistencia se cuantifica como el número de células que expresan CAR por microlitro de la muestra, por ejemplo, de sangre o suero, o por número total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o glóbulos blancos o linfocitos T por microlitro de la muestra. En determinados aspectos, la expansión se cuantifica como el aumento del número de células que expresan CAR por microlitro entre muestras, por ejemplo, de sangre o suero, o por número total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o glóbulos blancos o linfocitos T por microlitro de las muestras en el tiempo. En algunos casos, la farmacocinética, expansión y/o persistencia se miden o evalúan detectando la cantidad de células que expresan CAR en el sujeto y/o en muestras recolectadas del sujeto en múltiples puntos temporales. En determinados casos, las una o más muestras se recogen, obtienen y/o extraen del sujeto en un plazo de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, 3 meses, 4 meses, 6 meses, un año o más de un año después de que se administra la composición celular terapéutica.

En algunos casos, se divulga un método para seleccionar células que expresan un CAR que comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende poner en contacto una población de células que comprende células que expresan el CAR con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo o un inmunocombinado de anticuerpo antiidiotipo descrito en el presente documento y seleccionar células unidas con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, las células unidas con el anticuerpo antiidiotipo se seleccionan mediante separación basada en afinidad. En algunos casos, la separación basada en afinidad se selecciona del grupo que consiste en la separación basada en inmunofluorescencia, citometría de flujo, separación basada en magnetismo y cromatografía de afinidad. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo o el inmunocombinado del anticuerpo antiidiotipo está unido o inmovilizado de forma reversible a un soporte o una fase estacionaria. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para validar un CAR que comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende a) incubar una muestra que comprende linfocitos T transducidos con el CAR con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo dirigido al CAR; b) determinar el porcentaje de células unidas al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo; y c) validar el CAR en función del porcentaje de linfocitos T unidos al anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, se marca el anticuerpo antiidiotipo y se analizan los linfocitos T unidos al anticuerpo antiidiotipo mediante citometría de flujo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

También se divulgan métodos que implican el uso de los anticuerpos antiidiotipo divulgados y moléculas (tales como conjugados y complejos) que contienen uno o más de dichos anticuerpos antiidiotipo, para informar las decisiones de tratamiento en un individuo, tal como mediante la detección de CAR reconocidos por el anticuerpo antiidiotipo, tales como los CAR que comprenden un anticuerpo diana, tal como un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, anticuerpo SJ25C1 o FMC63), o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, los métodos sirven para informar decisiones de tratamiento en un individuo en asociación con una terapia que comprende la administración de linfocitos T CAR, tales como linfocitos T CAR anti-CD19. Los métodos en algunos casos incluyen incubar y/o sondear una muestra biológica con el anticuerpo antiidiotipo y/o administrar el anticuerpo antiidiotipo al individuo. En determinados casos, una muestra biológica incluye una célula o tejido o porción del mismo, tal como tejido tumoral o canceroso o biopsia o sección del mismo. En determinados casos, la incubación se realiza en condiciones que permiten la unión del anticuerpo antiidiotipo a los CAR presentes en la muestra. En algunos casos, los métodos incluyen además detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo antiidiotipo y los CAR en la muestra, tal como detectar la presencia o ausencia o el nivel de dicha unión. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*.

En un caso, se utiliza un anticuerpo antiidiotipo para determinar si es necesario ajustar una terapia con linfocitos T CAR en un individuo, por ejemplo, cuando niveles bajos de linfocitos T CAR en el individuo indican la necesidad de ajustar la terapia. En algunos casos, el anticuerpo diana es un anticuerpo anti-CD19. En algunos casos, el anticuerpo diana es o deriva del anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana es o deriva del anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para evaluar una terapia con linfocitos T CAR en un individuo, en donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende incubar una muestra del individuo con un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo dirigido al CAR y determinar la cantidad de linfocitos T unidos con el anticuerpo antiidiotipo, y determinar el beneficio terapéutico potencial de la terapia en función de la cantidad de linfocitos T unidos al anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, se marca el anticuerpo antiidiotipo y se analizan los linfocitos T unidos al anticuerpo antiidiotipo mediante citometría de flujo. En algunos casos, la muestra es una muestra derivada de sangre, o es o deriva de un producto de aféresis o leucocitaféresis. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para evaluar una terapia con linfocitos T CAR en un individuo. En algunos aspectos, el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como un anticuerpo que es o deriva de SJ25C1 o FMC63, tal como un fragmento de unión a antígeno de SJ25C1 de longitud completa o FMC63. En algunos casos, el método incluye administrar un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo dirigido al CAR (por ejemplo, dirigido al anticuerpo, por ejemplo, fragmento de anticuerpo, del CAR) al individuo. En algunos aspectos, la administración se realiza tras el inicio de una primera dosis de la terapia. El método puede comprender determinar la presencia del anticuerpo antiidiotipo en uno o más tejidos/órganos del individuo. En algunos aspectos, el método incluye determinar el beneficio terapéutico potencial de la terapia basándose en la presencia del anticuerpo antiidiotipo en al menos uno de los uno o más tejidos/órganos. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo está marcado y la presencia del anticuerpo antiidiotipo en el individuo se determina mediante imágenes en el individuo para detectar el marcador. En algunos casos, determinar la presencia del anticuerpo antiidiotipo en uno o más tejidos/órganos en el individuo incluye o se lleva a cabo determinando un nivel del anticuerpo antiidiotipo o su unión en uno o más tejidos/órganos.

En algunos casos, el método comprende además administrar el anticuerpo antiidiotipo al individuo después del inicio de una segunda dosis o dosis posterior de la terapia y/o determinar la presencia del anticuerpo antiidiotipo en uno o más tejidos/órganos del individuo. En algunos aspectos, el método implica además determinar el beneficio terapéutico potencial de la terapia basándose en la diferencia en el nivel del anticuerpo antiidiotipo en al menos uno de los uno o más tejidos/órganos del individuo entre la primera y la segunda administración del anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para ajustar una terapia con linfocitos T CAR en un individuo, en donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el método incluye incubar o poner en contacto una muestra del individuo con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo dirigido al CAR. En algunos aspectos, el método

incluye determinar la cantidad de linfocitos T unidos con o al anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos, el método incluye ajustar la terapia en función de la cantidad de linfocitos T unidos al anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo está marcado directa o indirectamente. En algunos aspectos de tales casos, los linfocitos T unidos al anticuerpo antiidiotipo se obtienen imágenes *in vivo* o *ex vivo*, tales como, en algunos casos, mediante el análisis de una muestra, del sujeto al que se le administraron los linfocitos T-CAR y el anticuerpo antiidiotipo, mediante citometría de flujo. En algunos casos, la muestra es sangre o una muestra derivada de sangre y/o es o deriva de un producto de aféresis o leucocitaféresis. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para ajustar una terapia con linfocitos T CAR en un individuo. En algunos aspectos, dicho método se lleva a cabo para una terapia de linfocitos T-CAR donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, incluyendo un fragmento de unión a antígeno de SJ25C1 o FMC63. El método en algunos casos comprende administrar, al individuo, un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se dirige o se une al CAR después del inicio de la administración de una primera dosis de la terapia y determina la presencia, ausencia o el nivel del anticuerpo antiidiotipo en uno o más tejidos/órganos del individuo. En algunos aspectos, el método incluye ajustar la terapia en función de la presencia, ausencia o el nivel del anticuerpo antiidiotipo en al menos uno de los uno o más tejidos/órganos. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se marca directa o indirectamente y, en algunos casos, la presencia del anticuerpo antiidiotipo en el individuo se determina mediante imágenes del individuo para detectar el marcador. En algunos casos, determinar la presencia del anticuerpo antiidiotipo en uno o más tejidos/órganos en el individuo comprende determinar un nivel de o para el anticuerpo antiidiotipo en uno o más tejidos/órganos o la unión de los mismos. En algunos casos, el método comprende además administrar el anticuerpo antiidiotipo al individuo después del inicio de una segunda dosis o dosis posterior de administración de la terapia y en algunos aspectos determinar la presencia, ausencia o el nivel del anticuerpo antiidiotipo en uno o más tejidos/órganos en el individuo, y/o ajustar la terapia en base a las observaciones, tal como en base a la diferencia en el nivel del anticuerpo antiidiotipo en al menos uno de los uno o más tejidos/órganos en el individuo entre la primera y la segunda administraciones del anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos aspectos, la terapia se ajusta (i) si el número de células de la terapia de linfocitos T es detectable en la sangre u otra muestra biológica, después de haber sido detectable, no es detectable o se ha reducido, opcionalmente reducido en comparación con un punto de tiempo anterior después de la administración de la terapia con linfocitos T; (ii) el número de células de la terapia de linfocitos T detectables en la sangre u otra muestra biológica se reduce en o más de 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 10 veces o más el pico o número máximo de células de la terapia de linfocitos T detectable en la sangre o la muestra biológica del sujeto después del inicio de la administración de la terapia de linfocitos T, opcionalmente la primera, la segunda dosis o las dosis posteriores; (iii) en un momento posterior a que se detecte un pico o nivel máximo de células de la terapia de linfocitos T en la sangre del sujeto, el número de células de o derivadas de los linfocitos T detectables en la sangre del sujeto es inferior al 10 %, menos del 5 %, inferior al 1 % o inferior al 0,1 % del total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en la sangre del sujeto; y/o (iv) si el número de células CD3+ o CD8+ de la terapia celular detectable en la sangre es inferior a 20 células por μl , 15 células por μl , 10 células por μl , inferior a 5 células por μl o inferior a 1 célula por μl . En algunos casos, la terapia se ajusta administrando una o más dosis adicionales de la terapia con linfocitos T-CAR, administrando una dosis mayor de la terapia con linfocitos T-CAR, administrando una terapia alternativa con linfocitos T-CAR específica para el mismo antígeno o para uno diferente, administrando uno o más agentes inmunomoduladores u otro agente para promover o aumentar la expansión o persistencia de las linfocitos T-CAR.

Se pueden usar diversos métodos conocidos en la técnica para detectar la unión de anticuerpo-antígeno específico. Los inmunoensayos ilustrativos incluyen inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), inmunoensayo de fluorescencia (FIA), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayo de inhibición nefelométrica (NIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA). Un grupo indicador o un grupo de marcaje, puede fijarse a los anticuerpos antiidiotipo y se selecciona para satisfacer las necesidades de diversos usos del método que a menudo están dictados por la disponibilidad de los equipos de ensayo y los procedimientos de inmunoensayo compatibles. Los marcadores ilustrativos incluyen radionucleidos por ejemplo, ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H o ^{32}P y/o cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Dy , ^{159}Gd), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), ruterio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), ^{85}Sr , azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, luciferasa o β -galactosidasa), fracciones o proteínas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP o BFP) o fracciones luminiscentes (por ejemplo, Qpunto™ nanopartículas suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, Calif.). Se conocen varias técnicas generales que se pueden utilizar para realizar los diversos inmunoensayos

mencionados anteriormente.

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo no necesitan estar marcados, y su presencia puede detectarse utilizando un anticuerpo marcado que se une a cualquiera de los anticuerpos antiidiotipo.

5 Los anticuerpos antiidiotipo divulgados en el presente documento se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

10 Los anticuerpos antiidiotipo también se pueden utilizar para ensayos de diagnóstico *in vivo*, tales como obtención de imágenes *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo antiidiotipo está marcado con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I o ^3H) para que las células o el tejido de interés se puedan localizar *in vivo* después de la administración a un individuo.

15 En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está inmovilizado o unido en un soporte sólido, en donde una o más células diana que comprenden linfocitos T-CAR se ponen en contacto con el soporte sólido. En algunos casos, el soporte sólido es una perla. En algunos casos, el soporte sólido es la superficie de un pocillo o placa, por ejemplo, una placa de cultivo celular. En algunos casos, el soporte sólido es una resina o matriz presente o contenida en una columna de cromatografía, por ejemplo, para permitir el aislamiento cromatográfico o la selección de linfocitos T CAR+. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno está o es capaz de estar unido reversiblemente a un soporte sólido. En algunos casos, el soporte sólido es una matriz de cromatografía de afinidad que comprende uno o más sitios de unión capaces de unirse, por ejemplo, unión reversible, a un compañero de unión presente en el anticuerpo antiidiotipo. En un caso ilustrativo, el anticuerpo antiidiotipo comprende un péptido de unión a estreptavidina u otra fracción de unión a estreptavidina capaz de unirse a una molécula de estreptavidina o muteína de estreptavidina presente o inmovilizada en el soporte sólido, que, en algunos casos, puede disociarse en presencia de una sustancia de competencia, tal como biotina. Ejemplos de tales sistemas incluyen los descritos en la solicitud de patente publicada en EE. UU. N.º US20150024411.

30 En algunos aspectos, los anticuerpos anti-ID divulgados en el presente documento pueden expresarse en la superficie de una célula. En algunos aspectos, se puede utilizar un anticuerpo anti-ID expresado en células para inducir o estimular una célula que exprese CAR, tal como parte de un sistema para el crecimiento selectivo de células CAR. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-ID o fragmento de unión a antígeno del mismo se expresa en una célula presentadora de antígeno artificial (aAPC). Las aAPC que expresan anti-ID se pueden utilizar como reactivos para la estimulación o expansión de poblaciones de linfocitos T CAR.

35 Se conocen métodos para preparar o generar aAPC, véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. números 6.225.042, 6.355.479, 6.362.001, 6.790.662; 7.754.482; Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2009/0017000 y 2009/0004142; y la publicación internacional n.º WO2007 103009. Se conocen varias aAPC en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 8.722.400, la solicitud publicada N.º US2014/0212446; Butler and Hirano (2014) Immunol Rev., 257(1):10. 1111/imr. 12129; Suhoshki *et al.* (2007) Mol. Ther., 15:981-988).

45 las aAPC incluyen características de las APC naturales, incluyendo la expresión de una molécula MHC, molécula o moléculas estimuladoras y coestimuladoras, receptor Fc, molécula o moléculas de adhesión y/o la capacidad de producir o secretar citocinas (por ejemplo, IL-2). Normalmente, una aAPC es una línea celular que carece de expresión de uno o más de los anteriores y se genera mediante la introducción (por ejemplo, mediante transfección o transducción) de uno o más de los elementos que faltan necesarios para la estimulación de una célula, por ejemplo, un linfocito T-CAR.

50 En algunos casos, las células seleccionadas para convertirse en aAPC tienen deficiencias en el procesamiento intracelular del antígeno, tráfico intracelular de péptidos y/o carga intracelular de moléculas-péptidos del MHC de clase I o clase II. En algunos aspectos, estas células también carecen de la capacidad de expresar una molécula MHC de clase I o clase II y/o moléculas involucradas o relacionadas con el procesamiento de antígenos. Las aAPC ilustrativas constituyen o derivan de un transportador asociado con la línea celular deficiente en el procesamiento de antígeno (TAP), tal como una línea celular de insecto. Una línea celular ilustrativa es una línea celular de *Drosophila*, tal como una línea celular Schneider 2 (véase, por ejemplo Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 1972 Vol 27, págs. 353-365). Métodos ilustrativos para la preparación, crecimiento y cultivo de células Schneider 2, se proporcionan en las patentes de Estados Unidos n.º 6,225,042, 6,355,479 y 6,362,001.

60 En algunos casos, la célula es una célula K652 o una célula derivada de K562. En algunos casos, la célula es la línea celular disponible en la ATCC N.º CCL-243.

65 En algunos aspectos, la aAPC se modifica además para expresar una molécula adicional para mejorar, potenciar o aumentar la estimulación de un linfocito T que expresa CAR. En algunos casos, la molécula adicional es un ligando inmunoestimulador, un ligando coestimulador, una citocina o una molécula de adhesión. En algunos casos, el ligando coestimulador se une específicamente con al menos una molécula coestimuladora presente en un linfocito T. En algunos casos, se genera la aAPC, por ejemplo por transducción o transfección, para expresar una o más señales

coestimuladoras (por ejemplo, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotoxina beta, ILT3, ILT4, 3/TR6 o un ligando de B7-H3; o un anticuerpo que se une específicamente a CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, receptor de ligando Toll o un ligando de CD83), una molécula de adhesión celular (por ejemplo, ICAM-1 o LFA-3) y/o una citocina (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, interferón alfa (IFN α), interferón beta (IFN β), interferón gamma (IFN γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de necrosis tumoral beta (TNF β), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). En algunos casos, una aAPC normalmente no expresa una molécula de MHC, pero puede diseñarse para expresar una molécula de MHC o, en algunos casos, es o puede ser inducida a expresar una molécula de MHC, tal como por estimulación con citocinas. En algunos casos, las aAPC también se pueden cargar con un ligando estimulador o coestimulador, que puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 o un anticuerpo anti-CD2. En algunos casos, la aAPC expresa una molécula capaz de mediar una señal primaria en la célula, tal como mediada a través del complejo receptor de linfocitos T/CD3 en un linfocito T. En algunos casos, las aAPC comprenden un ligando estimulador que se une específicamente a un complejo TCR/CD3 de modo que se transduce una señal primaria.

En algunos casos, dado que el anti-ID es capaz de entregar una señal a través del CAR, la aAPC no expresa un ligando estimulador que se una específicamente a un complejo TCR/CD3. En algunos casos, la aAPC no expresa una molécula coestimuladora.

En algunos casos, el anti-ID se expresa como un fragmento de cadena única (scFv) para su expresión en la superficie de la célula. El ácido nucleico que codifica el scFv se puede fusionar a secuencias de ADN que codifican un dominio transmembrana. Las regiones transmembrana de particular uso incluyen aquellas derivadas de la(s) región(es) transmembrana(s) del gen alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos casos, un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se encontrará en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Los dominios transmembrana ilustrativos incluyen aquellos derivados de CD8 o CD28.

B. Uso en estimulación celular

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo divulgados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son agonistas y/o exhiben actividad específica para estimular células que expresan un anticuerpo objetivo, incluidos conjugados o receptores quiméricos que lo contienen, tal como un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, anticuerpo SJ25C1 o FMC63), o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, se divulgan métodos que implican el uso de los anticuerpos antiidiotipo divulgados y moléculas (tales como conjugados y complejos) que contienen uno o más de dichos anticuerpos antiidiotipo, para la estimulación o activación de células que expresan CAR u otros receptores quiméricos, tales como linfocitos T. En algunos aspectos, el CAR u otro receptor comprende el anticuerpo diana, tal como un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, anticuerpo SJ25C1 o FMC63), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos casos, los métodos pueden utilizarse en relación con métodos de preparación de linfocitos T modificados genéticamente, tal como en métodos de expansión de linfocitos T modificados genéticamente u otras células en las que se ha introducido una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor quimérico, como el CAR que comprende el anticuerpo diana, por ejemplo, por transfección, transducción o un medio no vírico de transferencia de ácido nucleico, tales como abordajes basados en transposones. En algunos aspectos, el anticuerpo diana es un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, anticuerpo SJ25C1 o FMC63), o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En casos particulares, el anticuerpo diana es o contiene un CAR, por ejemplo, un CAR anti-CD19. En casos particulares, el CAR anti-CD19 contiene un scFv que proviene y/o deriva de un anticuerpo anti-CD19 tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63.

Los métodos en algunos casos incluyen la incubación de una muestra que comprende linfocitos T transducidos con un CAR con el anticuerpo antiidiotipo. En determinados casos, los métodos incluyen además detectar si los linfocitos T-CAR están activados o estimulados, tal como evaluando la viabilidad, proliferación y/o expresión de marcadores de activación en los linfocitos T-CAR. En algunos casos, el anticuerpo diana es un anticuerpo anti-CD19. En algunos casos, el anticuerpo diana es o deriva del anticuerpo SJ25C1 o FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para simular células, que comprende incubar una composición de entrada que comprende células que expresan un CAR que comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento, generando de esta manera una composición de salida que comprende células estimuladas. En algunos casos, la incubación se realiza en condiciones en las que el anticuerpo

antidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al CAR, induciendo o modulando de este modo una señal en una o más células en la composición de entrada. En algunos casos, las células comprenden linfocitos T. En algunos casos, los linfocitos T comprenden linfocitos T CD4+ y/o CD8+.

En algunos casos, en el presente documento se divulga un método para estimular o expandir células que expresan un CAR, incubando una composición de entrada que contiene células que expresan un CAR con un anticuerpo anti-ID que se une a y/o reconoce el CAR. En algunos casos, la unión entre el anticuerpo anti-ID y el CAR induce la expansión de las células que expresan el CAR, produciendo de este modo una composición de salida que comprende células expandidas.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se pone en contacto o se incuba con una composición de entrada de una o más células para generar una composición de salida. En determinados casos, las células de entrada y/o la composición de entrada son una composición y/o una pluralidad de células que son, o se desea que sean, tratadas, incubadas o puestas en contacto en condiciones que producirán uno o más cambios en al menos una parte de las células de la composición de entrada, convirtiendo así la composición de entrada en una composición de salida. En algunos casos, las células de entrada son una composición de células inmunitarias, por ejemplo, una composición de linfocitos T que contienen células que expresan un CAR. En casos particulares, al menos una parte de las células de la composición de entrada están activadas, expandidas y/o enriquecidas en la composición de salida generada mediante la práctica de los métodos descritos.

En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo expande o enriquece las células que expresan CAR de una composición de entrada. En algunos casos, la composición de entrada comprende células eucariotas, tal como células de mamíferos. En determinados casos, la composición de entrada contiene células humanas. En algunos casos, la composición de entrada contiene células que derivan de la sangre, médula ósea, linfa u órganos linfoides. En casos particulares, la composición de entrada contiene células del sistema inmunológico, es decir, células de la inmunidad innata o adaptativa, por ejemplo, células mieloides o linfoides, incluyendo linfocitos, normalmente linfocitos T y/o linfocitos citolíticos naturales. En algunos casos, la composición de entrada contiene células madre, tales como las células madre multipotentes y pluripotentes, incluidas las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En casos particulares, la composición de entrada contiene células CD3⁺. En determinados casos, la composición de entrada contiene células CD4⁺. En algunos casos, la composición de entrada contiene células CD8⁺. En algunos casos, la composición de entrada es una composición de células CD4⁺. En casos particulares, la composición de entrada es una composición de células CD8⁺.

En algunos casos, los métodos y agentes son capaces de estimular linfocitos T deficientes o que han regulado a la baja una o más moléculas de señalización natural, como uno o más receptores coestimuladores o receptores de antígenos o receptores de citocinas, pero que expresan el receptor quimérico, por ejemplo, el CAR, reconocido por el anticuerpo anti-ID. En algunos casos, las células de la composición de entrada son bajas o negativas para la expresión superficial de CD28 u otra molécula coestimuladora u otra molécula de señalización. Así, en algunos casos, los agentes y métodos divulgados tienen ciertas ventajas en comparación con ciertos otros agentes o métodos de activación o estimulación que pueden requerir o depender de la expresión superficial de CD28 u otra molécula de señalización endógena, para proporcionar la señal deseada y/o la extensión completa de dicha señal, por ejemplo, para proporcionar una señal coestimuladora y/o lograr una activación completa. En algunos casos, los agentes y métodos divulgados son ventajosos en tales aspectos en comparación con los reactivos anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo, perlas); en algunos aspectos, los anticuerpos anti-ID descritos son ventajosos porque pueden estimular o lograr un efecto deseado, como la activación o proliferación de células que son bajas o negativas para CD28 u otra molécula de señalización natural. En algunos aspectos, la señalización a través del CAR mediante la estimulación con un anticuerpo anti-ID da como resultado una señal primaria y secundaria (coestimuladora) a través del CAR utilizando solo un reactivo. En algunos casos, la composición de entrada comprende células CD3+ que expresan niveles bajos de CD28 u otra molécula de señalización endógena. En algunos casos, la composición de entrada comprende células CD3+ que son CD28 negativas o son negativas para otras moléculas de señalización endógena. En algunos casos, el anticuerpo anti-ID estimula la activación y/o expansión de células que expresan niveles bajos de CD28 o células que son CD28 negativas. En algunos casos, las células se ponen en contacto con un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno que está inmovilizado o unido a un soporte sólido. En algunos casos, el soporte sólido es una perla. En algunos casos, el soporte sólido es la superficie de un pocillo o placa, por ejemplo, una placa de cultivo celular. En algunos ejemplos, el anticuerpo anti-ID es soluble. En determinados casos, las células no entran en contacto con reactivos conjugados anti-CD3/anti-CD28 antes de ponerlas en contacto con el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno.

En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo se aplica a, se pone en contacto con o se incuba con una composición de entrada de células que han sido transducidas o transfectadas con un nucleótido que codifica un CAR. En casos particulares, la incubación, el tratamiento y/o el contacto de las células de entrada con el anticuerpo antiidiotipo da como resultado una expansión y/o enriquecimiento de las células que expresan el CAR. En casos particulares, la incubación, el tratamiento y/o el contacto de las células de entrada con el anticuerpo antiidiotipo no da como resultado una expansión y/o enriquecimiento de células que no expresan el CAR. En casos particulares, la incubación, el tratamiento y/o el contacto de las células de entrada con el anticuerpo antiidiotipo da como resultado una expansión y/o enriquecimiento de células que no expresan el CAR que es al menos del 50 %, al menos el 75 %.

al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 %, al menos el 99,9 % o al menos el 99,99 % menos que la expansión y/o enriquecimiento de células que expresan el CAR. En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo divulgados en el presente documento se utilizan para expandir células que expresan CAR de una composición de entrada que experimentó una baja eficiencia de transducción y/o transfección, y/o que contiene una

5 baja cantidad de células que expresan CAR. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo expande y/o enriquece selectivamente las células que expresan un CAR.

Algunos casos contemplan que el anticuerpo antiidiotipo es más eficaz para expandir y/o enriquecer células de una composición de entrada con una baja eficiencia de transducción o transfección y/o tienen una baja cantidad de células

10 que expresan el CAR que expandiendo y/o enriqueciendo las células mediante estimulación policlonal, por ejemplo, estimulación con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28. En casos particulares, la estimulación policlonal da como resultado la expansión de células que expresan y células que no expresan el CAR en la composición de entrada y, por lo tanto, en algunos casos, puede no enriquecer las células que expresan CAR, en particular cuando la composición de entrada tiene un número bajo de células que expresan CAR. En cambio, en algunos casos, la

15 incubación con un anticuerpo antiidiotipo da como resultado una expansión selectiva de células que expresan CAR y, por lo tanto, en determinados casos, dar lugar a una expansión selectiva y/o enriquecimiento de las células que expresan CAR. En algunos casos, la incubación, el contacto y/o el tratamiento de las células de entrada con el anticuerpo antiidiotipo da como resultado un mayor enriquecimiento y/o expansión de las células que expresan CAR que mediante la estimulación policlonal.

En casos particulares, el anticuerpo antiidiotipo se incuba con, se aplica a y/o se pone en contacto con células de entrada que fueron transfectadas y/o transducidas con una menor cantidad de partículas víricas, relación entre copias de partículas del vector vírico y las células y/o unidades infecciosas (UI), que las células de entrada que se expanden y/o enriquecen mediante estimulación policlonal. Por ejemplo, en algunos casos, la composición de entrada que se

25 incuba con el anticuerpo antiidiotipo se genera a partir de células que fueron transducidas con o con al menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 UI menos por célula que la composición de entrada que se expande y/o enriquece mediante estimulación policlonal. En algunos casos, la composición de entrada que se incuba con el anticuerpo antiidiotipo se genera a partir de células que fueron transducidas con un título de partículas de vector vírico con o con al menos 1×10^5 UI/ml, 5×10^5 UI/ml, 1×10^6 UI/ml, 5×10^6 UI/ml, 6×10^6 UI/ml, 7×10^6 UI/ml, 8×10^6 UI/ml, 9×10^6

30 UI/ml o 1×10^7 UI/ml menos que la composición de entrada que se expande y/o enriquece mediante estimulación policlonal.

En casos particulares, la transducción de células con una alta UI/célula conducirá a una alta eficiencia de transducción pero, en algunos casos, también puede dar lugar a células transfectadas con un alto número de copias del vector (VCN), que pueden presentar riesgos de seguridad y no cumplir con las normas reguladoras. En casos particulares, reducir las UI/célula con las que se transducen las células reducirá la eficiencia de transducción, pero reducirá el VCN. En casos particulares, aumentar las UI/célula con las que se transducen las células aumentará la eficiencia de la transducción, pero también aumentará el VCN.

En algunos casos, una composición de entrada contiene una población de células que han sido transducidas o transfectadas, o células que se derivan de células que han sido transducidas o transfectadas, con uno o más ácidos nucleicos que codifican un CAR, que está unido o reconocido por el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la composición de entrada contiene menos del 80 %, menos del 75 %, menos del 70 %, menos del 65 %, menos del 60 %, menos del 55 %, menos del 50 %, menos del 45 %, menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos

45 del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 % de las células son células que expresan CAR. En casos particulares, las células de la composición de entrada han sido transfectadas o transducidas como se describe en la Sección III. En determinados casos, las células de entrada contienen una población de células que han sido transducidas o transfectadas, o células que se derivan de células que han sido transducidas o transfectadas, con uno o más ácidos nucleicos que codifican un CAR anti-CD19, tal como un CAR anti-CD19 que contiene un scFv que proviene y/o deriva de un anticuerpo anti-CD19 tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63.

En casos particulares, la incubación, el contacto o tratamiento de células de la composición de entrada con el anticuerpo antiidiotipo se realiza en condiciones de estimulación, expansión y/o activación de células cuyas condiciones pueden incluir uno o más medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

En algunos casos, las células de la composición de entrada han sido transfectadas o transducidas con un ácido nucleico que comprende un gen que codifica un CAR y las células se ponen en contacto, se incuban o se tratan con el anticuerpo antiidiotipo que se une o reconoce el receptor recombinante. En algunos casos, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban o se ponen en contacto con el anticuerpo antiidiotipo después de que las células fueran transducidas o transfectadas con el ácido nucleico que codifica un CAR. En casos particulares, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban o se ponen en contacto con el anticuerpo antiidiotipo inmediatamente, en aproximadamente 1 minuto, en aproximadamente 5 minutos, en aproximadamente 30 minutos,

en aproximadamente 1 hora, en aproximadamente las 2 horas, en aproximadamente las 4 horas, en aproximadamente las 6 horas, en aproximadamente las 8 horas, en aproximadamente las 12 horas, en aproximadamente las 24 horas, en aproximadamente 2 días, en aproximadamente 3 días, en aproximadamente 4 días, en aproximadamente 5 días, en aproximadamente 6 días, en aproximadamente 1 semana, en aproximadamente 2 semanas, en aproximadamente 3 semanas, en aproximadamente 4 semanas, en aproximadamente 5 semanas, o en aproximadamente 6 semanas después de que las células de la composición de entrada hayan sido transducidas o transfectadas.

En algunos casos, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban y/o se ponen en contacto con anticuerpo antiidiotipo soluble, se ponen en contacto con un anticuerpo que no está reticulado y/o en contacto con un anticuerpo que no está unido o fijado a un soporte sólido

En algunos casos, los métodos dan lugar a proliferación, la activación, estimulación, liberación de citocinas u otro resultado funcional tal como regulación por aumento de un marcador de activación o liberación o producción de citocinas, de células que expresan el receptor quimérico tal como el CAR reconocido por el anticuerpo anti-Id. En algunos aspectos, dicha proliferación u otra respuesta o lectura funcional se induce en dichas células hasta un grado similar o mayor que el inducido por la incubación de las células con un agente y/o condiciones que estimulan la proliferación de linfocitos T, tal como cuentas anti-CD3/CD28 y/o anti-CD3 reticulado. En algunos aspectos, los métodos no implican la reticulación del anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos de cualquiera de los casos, los agentes antiidiotipo son capaces de inducir la proliferación especificada o el resultado funcional o el grado del mismo, sin reticulación del anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos, los agentes antiidiotipo del presente documento son ventajosos por su capacidad para estimular o provocar un resultado funcional particular de los linfocitos T u otras células inmunitarias que expresan el receptor diana, sin necesidad de reticular el anticuerpo anti-Id o utilizar un agente secundario. En algunos aspectos, el resultado se consigue con la forma soluble o unida a placa del anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos, el resultado se consigue con el anticuerpo antiidiotipo acoplado a una cuenta.

. En casos particulares, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban y/o se ponen en contacto con entre 10 pg/ml y 100 µg/ml, entre 1 pg/ml y 1 ng/ml, entre 1 ng/ml y 1 µg/l entre 100 ng/ml y 1,0 µg/ml, entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, entre 10 ng/ml y 1,0 µg/ml, entre 100 ng/ml y 10 pg/ml, entre 250 ng/ml y 10 µg/ml, entre 250 pg/ml y 1 ng/ml, entre 1 µg/ml y 10 µg/ml, entre 250 ng y aproximadamente 2,5 µg/ml, o entre 1 µg/ml y 10 µg/ml.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está inmovilizado en un soporte sólido, que opcionalmente comprende o está conjugado con un reactivo que comprende una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse reversiblemente al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el soporte sólido es una superficie de una placa o de un pocillo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está inmovilizado en un reactivo soluble, que opcionalmente es o comprende una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse reversiblemente al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el reactivo comprende una muteína de estreptavidina. En un caso ilustrativo, el anticuerpo antiidiotipo comprende un péptido de unión a estreptavidina u otra fracción de unión a estreptavidina capaz de unirse a una molécula de estreptavidina o muteína de estreptavidina presente o inmovilizada en el reactivo soluble, que, en algunos casos, puede disociarse en presencia de una sustancia de competencia, tal como biotina. Ejemplos de tales sistemas incluyen los descritos en la solicitud de patente PCT publicada N.º WO2015/158868.

En casos particulares, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban y/o se ponen en contacto con el anticuerpo antiidiotipo que está fijado, unido, recubierto y/o conjugado con una superficie o soporte sólido, por ejemplo, una placa o un pocillo. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo se ha fijado, unido, recubierto y/o conjugado con la superficie sólida o soporte incubando la superficie sólida o soporte con una concentración del anticuerpo antiidiotipo. En casos particulares, la superficie sólida o soporte se incubaba con entre 10 ng/ml y 100 µg/ml, entre 100 ng/ml y 1,0 µg/ml, entre 250 ng/ml y 10 µg/ml, entre 250 ng/ml y 1 µg/ml, entre 1 µg/ml y 10 µg/ml, entre 250 ng y 2,5 µg/ml, o entre 1 µg/ml y 10 µg/ml del anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la superficie sólida o soporte se incubaba con entre 250 ng/ml y 10 µg/ml. En determinados casos, la superficie sólida o soporte se incubaba con o con aproximadamente 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml o 10 µg/ml del anticuerpo antiidiotipo.

En algunos casos, la incubación dura al menos o aproximadamente al menos 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36, 48 horas, 72 horas o 96 horas. En algunos casos, la composición de entrada comprende menos de o menos de aproximadamente el 60 %, menos de o menos de aproximadamente el 50 %, menos de o menos de aproximadamente el 40 %, menos de o menos de aproximadamente el 30 %, menos de o menos de aproximadamente el 20 % o menos de o menos de aproximadamente el 10 % de células que expresan CAR como porcentaje del total de células en la composición. En algunos casos, el número de células que expresan CAR en la composición de salida aumenta en más de 1,2 veces, 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 10 veces o más en comparación con el número de células que expresan CAR en la composición de entrada; y/o el porcentaje de expresión de CAR en la composición de salida en comparación con el total de células en la composición aumenta en más del 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más. En algunos casos, antes de la incubación, las células no están seleccionadas ni enriquecidas para células que expresan CAR. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23

y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

5 En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo se ponen en contacto o se incuban con células de la composición de entrada, por ejemplo, que comprende células que expresan un CAR, por un período de tiempo determinado para expandir una o más células de la composición de entrada, tal como para expandir células de la composición de entrada que expresan el receptor recombinante. En casos particulares, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con el anticuerpo antiidiotipo durante al menos aproximadamente 12 horas, al menos
10 aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 3 semanas o al menos
15 aproximadamente 4 semanas. En casos particulares, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con el anticuerpo antiidiotipo durante menos de aproximadamente 1 día, menos de aproximadamente 2 días, menos de aproximadamente 3 días, menos de aproximadamente 4 días, menos de aproximadamente 5 días, menos de aproximadamente 6 días o menos de aproximadamente 12 días. En algunos casos, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con el anticuerpo antiidiotipo durante entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 14 días, entre aproximadamente 3 días y 7 días, o entre aproximadamente 4 días y 6 días.

En casos particulares, las células de una composición de entrada, por ejemplo, que comprende células que expresan un CAR, se incuban, se ponen en contacto o se tratan con anticuerpo antiidiotipo a temperaturas mayores que la
25 temperatura ambiente para expandir las células de la composición de entrada que expresan el receptor recombinante. En algunos casos, el tratamiento, la incubación o la puesta en contacto se realiza a una temperatura superior a aproximadamente 25 °C, tal como generalmente superiores a o superiores a aproximadamente 32 °C, 35 °C o 37 °C. En algunos casos, el tratamiento, el contacto o la incubación se realizan a una temperatura de aproximadamente 37 °C ± 2 °C, tal como a una temperatura de o aproximadamente de 37 °C.

30 En algunos casos, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 %, al menos el 99,9 %, aproximadamente el 100 % o el 100 % de las células de la composición de salida expresan el CAR.

35 En casos particulares, el número de células que expresan el CAR en la composición de salida que se incubó, trató y/o puso en contacto con el anticuerpo antiidiotipo es al menos del 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al
40 menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor que el número de células que expresan el CAR en la composición de entrada.

45 En casos particulares, el porcentaje de células que expresan el CAR en la composición de salida que se incubó, trató y/o puso en contacto con el anticuerpo antiidiotipo es al menos del 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al
50 menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor que el número de células que expresan el CAR en la composición de entrada.

En algunos casos, el número de células que expresan el CAR en la composición de salida que se incubó, trató y/o puso en contacto con el anticuerpo antiidiotipo es al menos del 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al
55 menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces mayor que el número de células de una composición de salida que recibió estimulación policlonal, incubación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

60 En determinados casos, el porcentaje de células que expresan el CAR en la composición de salida que se incubó, trató y/o puso en contacto con el anticuerpo antiidiotipo es al menos del 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos
65

el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces mayor que el número de células de una composición de salida que recibió estimulación policlonal, incubación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

En algunos casos, las células que expresan el CAR en la composición de salida que se incubó, trató y/o puso en contacto con el anticuerpo antiidiotipo contienen al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % menos de VCN que las células de una composición de salida que recibieron estimulación policlonal, por ejemplo, incubación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. En algunos casos, el VCN promedio de las células que expresan CAR de la salida no es más que aproximadamente 10, 5, 4, 2,5, 1,5 o 1.

En algunos casos, estos métodos se pueden utilizar como parte de los métodos de fabricación, analíticos y/o de control de calidad, por ejemplo, en asociación con la generación de terapias celulares que expresan polipéptidos recombinantes que contienen un anticuerpo o fragmento del mismo reconocido por el anticuerpo antiidiotipo, tales como los linfocitos T-CAR, con fines de ensayo, incluyendo la prueba de expresión y/o potencia del receptor diseñado, por ejemplo, en células diseñadas para su uso en terapia en un individuo. En determinados casos, las composiciones celulares pueden probarse en cualquier etapa del proceso de generación de linfocitos T que expresan CAR. En casos particulares, se puede recoger una muestra de células de una composición celular en cualquier etapa del proceso y almacenarla, por ejemplo, por criopreservación y/o criopreservación, para pruebas y/o análisis posteriores. Las composiciones probadas pueden ser composiciones farmacéuticas, por ejemplo, incluyendo aquellas que contienen las células y un receptor y/o agente crioconservante farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo estimula las células que expresan un anticuerpo diana, por ejemplo, un CAR, *in vivo*. Casos particulares contemplan que las terapias con linfocitos T-CAR son efectivas en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades y trastornos. Sin embargo, en determinados contextos, los enfoques disponibles para la terapia con linfocitos T-CAR pueden no ser siempre completamente satisfactorios. Por ejemplo, en algunos casos, la exposición y persistencia de las células que expresan CAR en el sujeto se reduce o disminuye con el tiempo. Sin embargo, las observaciones indican que, en algunos casos, una mayor exposición de las células que expresan CAR puede mejorar la eficacia y los resultados terapéuticos en la terapia con linfocitos T-CAR. Por lo tanto, en algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra para reforzar, aumentar y/o incrementar la persistencia y/o expansión de las células que expresan CAR.

En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra a un sujeto, tal como un sujeto al que se le ha administrado previamente una composición celular terapéutica que contiene células que expresan CAR. En algunos casos, la administración del anticuerpo antiidiotipo a un sujeto promueve la reexpansión de las células que expresan CAR en el sujeto, que, en algunos casos, puede alcanzar o superar el nivel máximo inicial de expansión antes de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra para modular la expansión y/o persistencia de las células que expresan CAR en momentos en que los niveles de las células que expresan CAR han disminuido o no son detectables. En algunos casos, las células que expresan CAR que se vuelven a expandir por el anticuerpo antiidiotipo exhiben una mayor potencia en un sujeto al que se le administra, por ejemplo, en comparación con la potencia antes de la administración del anticuerpo antiidiotipo.

En determinados casos, la administración del anticuerpo antiidiotipo aumenta o mejora la persistencia de las células que expresan CAR en el sujeto. En algunos casos, las células que expresan CAR son detectables en el sujeto al menos 7 días, 14 días, 21 días, 28 días, 35 días, 42 días, 49 días, 56 días, 63 días, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más de 6 meses después de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos, la mayor exposición del sujeto a las células incluye la expansión y/o el aumento de la expansión de las células.

En algunos casos, las células que expresan CAR se expanden en el sujeto después de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En casos particulares, la administración del anticuerpo antiidiotipo da como resultado una concentración máxima en la sangre o suero u otro fluido u órgano o tejido corporal del sujeto, de al menos 100, 500, 1000, 1500, 2000, 5000, 10 000 o 15 000 copias de un ácido nucleico que codifica el CAR por microgramo de ADN, o al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9 células que expresan CAR por microlitro. En algunos casos, las células que expresan el CAR se detectan como al menos el 10, 20, 30, 40, 50 o 60 % del total de PBMC en la sangre del sujeto, y/o en dicho nivel durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48 o 52 semanas después de la administración del anticuerpo antiidiotipo o durante 1, 2, 3, 4 o 5, o más años después de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En algunos aspectos, la administración del anticuerpo antiidiotipo da como resultado un aumento de al menos del doble, al menos 4 veces, al menos 10 veces o al menos de 20 veces en las copias de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante, por ejemplo, CAR, por microgramo de ADN, por ejemplo, en el suero, plasma, sangre o tejido, por ejemplo, muestra de tumor, del sujeto. En casos particulares, la administración del anticuerpo antiidiotipo da como resultado un aumento de al menos del doble, al menos 4 veces, al menos 10 veces o

al menos de 20 veces en el número de células que expresan CAR en el sujeto.

En algunos aspectos, se administrarán al menos aproximadamente 1×10^2 , se administrarán al menos aproximadamente 1×10^3 , se administrarán al menos aproximadamente 1×10^4 , al menos aproximadamente 1×10^5 , o al menos aproximadamente 1×10^6 o al menos aproximadamente 5×10^6 o al menos aproximadamente 1×10^7 o al menos aproximadamente 5×10^7 o al menos aproximadamente 1×10^8 células que expresan CAR y/o al menos 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 o 500 o 1000 células que expresan CAR por microlitro, por ejemplo, al menos 10 por microlitro, son detectables o están presentes en el sujeto o fluido, plasma, suero, tejido, o compartimento del mismo, tal como en la sangre, por ejemplo, sangre periférica o sitio de la enfermedad después de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, tal número o concentración de células es detectable en el sujeto durante al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 40 días, o al menos aproximadamente 60 días, o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o al menos 2 o 3 años, tras la administración del anticuerpo antiidiotipo.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar el anticuerpo antiidiotipo. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra mediante encapsulación y/o unión a liposomas, micropartículas y microcápsulas. Los métodos de administración del anticuerpo antiidiotipo incluyen, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El anticuerpo antiidiotipo puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión, mediante inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. También puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, usando un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente aerosolizante. En determinados casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249:1527-1533), por ejemplo un liposoma catiónico (documento WO 98140052).

En algunos casos, se divulga un método para producir una composición celular, que comprende introducir en las células una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, generando de este modo una composición de entrada e incubando la composición de entrada con un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el dominio de unión al antígeno del CAR, produciendo de esta manera la composición celular. En algunos casos, el CAR comprende un anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD 19. En algunos casos, el anticuerpo diana es el anticuerpo SJ25C1 o FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un agonista del CAR. En algunos casos, la introducción comprende la introducción de la molécula de ácido nucleico en las células mediante transducción vírica, transposición, electroporación o transfección química. En algunos casos, la introducción comprende la introducción de la molécula de ácido nucleico en las células mediante transducción con un vector retroviral que comprende la molécula de ácido nucleico, por transducción con un vector lentiviral que comprende la molécula de ácido nucleico, por transposición con un transposón que comprende la molécula de ácido nucleico, o por electroporación o transfección de un vector que comprende la molécula de ácido nucleico.

En algunos casos, el método comprende además una etapa de estimulación o activación de las células antes de introducir la molécula de ácido nucleico que codifica el CAR. En algunos casos, la activación de las células comprende poner en contacto las células con un agonista de CD3 y opcionalmente un agonista de CD28. En algunos casos, la activación de las células que comprende poner en contacto las células con un reactivo que comprende anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28. En algunos de dichos casos, durante al menos una parte del contacto con un anti-CD3/anti-CD28 y/o durante al menos una parte de la introducción del ácido nucleico que codifica el CAR, el método incluye incubar o poner en contacto las células con el anticuerpo antiidiotipo o el antígeno de unión. En algunos casos, la incubación se realiza en condiciones en las que el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al CAR, induciendo o modulando de este modo una señal en una o más células en la composición de entrada. En algunos casos, las células comprenden linfocitos T.

En algunos de dichos casos, los linfocitos T comprenden linfocitos T CD4+ y/o CD8+. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está inmovilizado en un soporte sólido, que opcionalmente comprende o está conjugado con un reactivo que comprende una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse reversiblemente al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo está inmovilizado en un reactivo soluble, que opcionalmente es o comprende una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse reversiblemente al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el reactivo comprende una muteína de estreptavidina. En un caso ilustrativo, el anticuerpo antiidiotipo comprende un péptido de unión a estreptavidina u otra fracción de unión a estreptavidina capaz de unirse a una molécula de estreptavidina o muteína de estreptavidina presente o inmovilizada en el reactivo soluble, que, en algunos casos, puede disociarse en presencia de una sustancia de competencia, tal como biotina. Ejemplos de tales sistemas incluyen los descritos en la solicitud de patente PCT publicada N.º WO2015/158868. En algunos casos, la incubación dura al menos o aproximadamente al menos 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36, 48 horas, 72 horas o 96 horas.

En algunos casos, la composición de entrada comprende menos de o menos de aproximadamente el 60 %, menos de o menos de aproximadamente el 50 %, menos de o menos de aproximadamente el 40 %, menos de o menos de aproximadamente el 30 %, menos de o menos de aproximadamente el 20 % o menos de o menos de aproximadamente el 10 % de células que expresan CAR como porcentaje del total de células en la composición. En algunos casos, el número de células que expresan CAR en la composición de salida aumenta en más de 1,2 veces, 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 10 veces o más en comparación con el número de células que expresan CAR en la composición de entrada; y/o el porcentaje de expresión de CAR en la composición de salida en comparación con el total de células en la composición aumenta en más del 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más. En algunos casos, antes de la incubación, las células no están seleccionadas ni enriquecidas para células que expresan CAR. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para monitorizar la actividad de un CAR que comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo las etapas de incubar una muestra que comprende linfocitos T transducidos con el CAR con un anticuerpo antiidiotipo agonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se dirige o se une al CAR; y/o determinar la presencia, ausencia o cantidad de activación, estimulación y/o expansión de los linfocitos T-CAR, de esta manera se monitoriza la actividad de las linfocitos T-CAR. En algunos casos, estos métodos se pueden utilizar para validar el CAR, en cuyo caso el método puede incluir c) validar el CAR en función del nivel de activación, estimulación y/o expansión de linfocitos T-CAR.

En algunos casos, la activación, estimulación y/o expansión de los linfocitos T-CAR se evalúa determinando la viabilidad, proliferación y/o expresión de marcadores de activación de linfocitos T en los linfocitos T CAR después de un período de incubación con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la viabilidad de los linfocitos T CAR se evalúa calculando el porcentaje de linfocitos T vivos frente al total transducido con el CAR después de la incubación con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la proliferación de linfocitos T CAR se evalúa mediante la dilución de un colorante utilizado para teñir las linfocitos T CAR antes de la incubación con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la expresión de marcadores de activación de linfocitos T se evalúa mediante citometría de flujo con tinción de anticuerpos que reconocen los marcadores de activación de linfocitos T. En algunos casos, los marcadores de activación de linfocitos T se seleccionan del grupo que consiste en CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD69, CD71, CD134, CD137 y CD154. En algunos casos, el período de incubación es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para monitorizar una preparación de linfocitos T CAR, en donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende a) incubar una porción de la preparación con un anticuerpo antiidiotipo agonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se dirige o se une al CAR; y b) determinar la presencia, ausencia o cantidad de activación, estimulación y/o expansión de los linfocitos T-CAR. En algunos casos, la preparación de linfocitos T-CAR puede ser de células producidas o fabricadas en condiciones particulares deseables para ser probadas. En algunos casos, el seguimiento se lleva a cabo en relación con un ensayo de liberación, tal como para validar las células antes de su administración a un sujeto. En algunos aspectos, el método incluye además c) validar la preparación en función del nivel de activación de los linfocitos T CAR. En algunos casos, la activación de los linfocitos T CAR en la preparación se evalúa determinando la viabilidad, proliferación y/o expresión de marcadores de activación de linfocitos T en los linfocitos T CAR después de un período de incubación con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la viabilidad de los linfocitos T CAR se evalúa calculando el porcentaje de linfocitos T vivos frente al total transducido con el CAR después de la incubación con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la proliferación de linfocitos T CAR se evalúa mediante la dilución de un colorante utilizado para teñir las linfocitos T CAR antes de la incubación con el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la expresión de marcadores de activación de linfocitos T se evalúa mediante citometría de flujo con tinción de anticuerpos que reconocen los marcadores de activación de linfocitos T. En algunos casos, los marcadores de activación de linfocitos T se seleccionan del grupo que consiste en CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD69, CD71, CD134, CD137 y CD154. En algunos casos, el período de incubación es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

C. Uso en la inactivación/agotamiento celular

En algunos casos, los anticuerpos antiidiotipo descritos o sus fragmentos de unión al antígeno son antagonistas y/o muestran una actividad específica para inhibir, ablacionar y/o agotar (por ejemplo, matar mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, CCDA) células que expresan un anticuerpo diana, tal como un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, anticuerpo SJ25C1 o FMC63), o un fragmento de unión a antígeno del mismo. También se divulgan métodos que implican el uso de los anticuerpos antiidiotipo divulgados y moléculas (tales como conjugados y complejos) que contienen uno o más de dichos anticuerpos antiidiotipo, para inactivación, ablación y/o agotamiento de linfocitos T CAR, en donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, anticuerpo SJ25C1 o FMC63), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los métodos en algunos casos incluyen el tratamiento, poner en contacto y/o incubar una composición y/o una muestra que comprende linfocitos T transducidos con un CAR con el anticuerpo antiidiotipo. En determinados casos, los métodos incluyen además detectar si los linfocitos T CAR están inactivados, tal como evaluando la viabilidad, proliferación y/o expresión de marcadores de activación en los linfocitos T-CAR. En algunos casos, los métodos están asociados con una terapia que comprende la administración de linfocitos T CAR. Los métodos en algunos casos incluyen la administración del anticuerpo antiidiotipo a un individuo. En un caso, se utiliza un anticuerpo o conjugado antiidiotipo para eliminar y/o agotar (por ejemplo, matar) los linfocitos T CAR en un individuo. En algunos casos, el anticuerpo diana es un anticuerpo anti-CD19. En algunos casos, el anticuerpo diana es o deriva del anticuerpo SJ25C1 o FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra para agotar, reducir y/o disminuir el número de células que expresan CAR en un sujeto. En casos particulares, la administración del anticuerpo antiidiotipo agota, reduce y/o disminuye la cantidad de células que expresan CAR, por ejemplo, linfocitos T-CAR circulantes, en al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 %, al menos el 99,9 %, un 100 % o aproximadamente un 100 %. En determinados casos, el agotamiento, la reducción y/o disminución está en relación con una cantidad de células que expresan CAR en el sujeto antes de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En casos particulares, el agotamiento, la reducción y/o disminución está en relación con una cantidad de células que expresan CAR en un sujeto al que no se le administra el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, las células que expresan CAR no son detectables en el sujeto después de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En casos particulares, el anticuerpo antiidiotipo es un anticuerpo humano o humanizado.

En algunos casos, se divulga un método para inactivar linfocitos T CAR, en donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende incubar una muestra que comprende los linfocitos T CAR con un anticuerpo antiidiotipo antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo dirigido al CAR, inactivando así los linfocitos T CAR en la muestra. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se utiliza en una cantidad suficiente para atenuar la activación de los linfocitos T CAR en la muestra. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se utiliza en una cantidad suficiente para inactivar sustancialmente los linfocitos T CAR en la muestra. En algunos casos, la incubación con el anticuerpo antiidiotipo da como resultado la ablación y/o el agotamiento de los linfocitos T CAR en la muestra. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se utiliza en una cantidad suficiente para dar como resultado el aclaramiento de los linfocitos T CAR en la muestra. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra para agotar, reducir y/o disminuir la actividad del CAR y/o las células que expresan CAR en un sujeto. En casos particulares, la administración del anticuerpo antiidiotipo reduce y/o disminuye la estimulación y/o activación del CAR y/o de la célula que expresa el CAR en al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos un 99,9 %, un 100 % o aproximadamente un 100 %. En determinados casos, la reducción y/o disminución está en relación con la estimulación y/o actividad del CAR y/o células que expresan CAR en el sujeto antes de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En casos particulares, la reducción y/o disminución está en relación con la estimulación y/o actividad del CAR y/o células que expresan CAR en un sujeto al que no se le ha administrado el anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la actividad y/o estimulación se refiere a uno o más aspectos de la actividad del receptor CAR o de las linfocitos T CAR y puede evaluarse mediante cualquier medio conocido adecuado, incluyendo por cualquier medio divulgado en el presente documento. En algunos casos, la actividad y/o estimulación del CAR y/o de las células que expresan CAR no son detectables en el sujeto después de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En casos particulares, el anticuerpo antiidiotipo es un anticuerpo humano o humanizado.

En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra para prevenir, reducir y/o disminuir la unión y/o la capacidad del CAR y/o de las células que expresan CAR para unirse al antígeno. En casos particulares, la administración del anticuerpo antiidiotipo reduce y/o disminuye la unión al antígeno del CAR y/o de la célula que expresa el CAR en al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos un 99,9 %, un 100 % o aproximadamente un 100 %. En determinados casos, la reducción y/o disminución está en relación con la unión al antígeno y/o la capacidad del CAR y/o de las células que expresan CAR para unirse al antígeno en el sujeto antes de la administración del anticuerpo antiidiotipo. En casos particulares, la reducción y/o disminución está en relación con la unión del antígeno y/o la capacidad de unirse al antígeno del CAR y/o las células que expresan CAR en un sujeto al que no se le administra el anticuerpo antiidiotipo. En casos particulares, el anticuerpo antiidiotipo es un anticuerpo humano o humanizado.

En algunos casos, se divulga un método para ablacionar y/o agotar (por ejemplo matar) linfocitos T CAR, en donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende incubar una muestra que comprende los linfocitos T CAR con un anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo dirigido al CAR, eliminando así y/o agotando los linfocitos T CAR en la muestra. En algunos casos, la ablación y/o depleción se realiza mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se utiliza en una cantidad suficiente para provocar la ablación y/o el agotamiento de prácticamente todos los linfocitos T CAR en la muestra. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para ajustar una terapia con linfocitos T CAR en un individuo, en donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende administrar un anticuerpo antiidiotipo antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo dirigido al CAR al individuo, inactivando así los linfocitos T CAR. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra en una cantidad suficiente para atenuar la activación de los linfocitos T CAR en el individuo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra en una cantidad suficiente para inactivar sustancialmente los linfocitos T CAR en el individuo. En algunos casos, la administración del anticuerpo antiidiotipo da como resultado la ablación y/o el agotamiento de los linfocitos T CAR en el individuo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se administra en una cantidad suficiente para provocar la eliminación de los linfocitos T CAR en el individuo. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

En algunos casos, se divulga un método para ajustar una terapia con linfocitos T CAR en un individuo, en donde el CAR comprende un anticuerpo diana, tal como el anticuerpo SJ25C1 o FMC63, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende administrar un inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo dirigido al CAR al individuo, en donde el inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo comprende un agente citotóxico. En algunos casos, el inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo se administra en una cantidad suficiente para atenuar la terapia con linfocitos T CAR en el individuo. En algunos casos, el inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo se administra en una cantidad suficiente para detener sustancialmente la terapia con linfocitos T CAR en el individuo. En algunos casos, el inmunoconjugado de anticuerpo antiidiotipo se administra en una cantidad suficiente para provocar la eliminación de los linfocitos T CAR en el individuo. En algunos casos, el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos) e isótopos radiactivos. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y/o una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31.

D. Uso en el ensayo de unión o método

En el presente documento se divulgan métodos para evaluar la presencia o ausencia de una molécula en una muestra que se une a un receptor de antígeno quimérico (CAR), tal como el dominio extracelular de un CAR o una porción del mismo que contiene el dominio de unión al antígeno. En algunos casos, los métodos se pueden utilizar para evaluar la presencia o ausencia de una respuesta humoral o una respuesta de anticuerpos en un sujeto a una terapia celular administrada que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico comprende un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico comprende un anticuerpo diana que es el anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico del dominio extracelular del CAR, tal como cualquiera descrito en el presente

documento, puede utilizarse como control positivo en el método.

En casos particulares, el método incluye poner en contacto una muestra con un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico del dominio extracelular del CAR a una concentración de entre 10 ng/ml y 100 µg/ml, entre 100 ng/ml y 1,0 µg/ml, entre 250 ng/ml y 10 µg/ml, entre 250 ng/ml y 1 µg/ml, entre 1 µg/ml y 10 µg/ml, entre 250 ng y 2,5 µg/ml o entre 1 µg/ml y 10 µg/ml del anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la concentración del anticuerpo antiidiotipo entre 250 ng/ml y 10 µg/ml. En determinados casos, la concentración del anticuerpo antiidiotipo es de aproximadamente 0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2 µg/ml, 2,5 µg/ml o 5 µg/ml del anticuerpo antiidiotipo.

En algunos aspectos, la terapia celular adoptiva puede estar asociada con el desarrollo de una respuesta inmunitaria en el sujeto a las células y/o al constructo administrado. Por ejemplo, en algunos casos, la exposición a un receptor quimérico puede estar limitada por las respuestas inmunitarias del hospedador contra los receptores recombinantes expresados por las células administradas, que puede eliminar prematuramente las células. Se observa que incluso en ciertos sujetos que tienen neoplasias malignas de linfocitos B, que a menudo están inmunodeprimidos, se pueden detectar respuestas inmunitarias específicas para regiones de receptores expresados por células administradas en terapia celular adoptiva. Por ejemplo, sujetos, por ejemplo, sujetos humanos, las células administradas modificadas genéticamente con un CAR pueden desarrollar una respuesta inmunitaria específica a una región inmunogénica de la región quimérica, incluyendo regiones que pueden contener secuencias no humanas (por ejemplo, scFv murino) y/o una región que contiene la unión entre dos dominios o porciones del receptor quimérico, por ejemplo, el dominio transmembrana y coestimulador del CAR.

En algunos casos, se divulgan métodos que implican poner en contacto o incubar un reactivo de unión con una muestra de un sujeto al que se le ha administrado una terapia celular que comprende una célula diseñada con un receptor de antígeno quimérico en el que el reactivo de unión es una proteína que incluye el dominio extracelular del CAR o una porción del mismo que contiene el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, los métodos incluyen además detectar si se forma un complejo entre el reactivo de unión y una molécula, por ejemplo, molécula de unión, tal como un anticuerpo, presente en la muestra, y/o detectar la presencia o ausencia o nivel de dicha unión. En determinados casos, el contacto o la incubación se realizan en condiciones que permiten la unión del reactivo de unión a una molécula presente en la muestra del sujeto. En determinados aspectos, el método puede llevarse a cabo además en una muestra de control positivo que contiene un anticuerpo antiidiotípico o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el CAR, tales como cualquiera como se describe. En algunos casos, determinando la presencia, la ausencia o el nivel de unión de la molécula al reactivo de unión puede incluir la comparación de la unión o la detección con la unión o la detección de la muestra de control positivo al reactivo de unión.

En algunos casos, la terapia celular es o comprende células modificadas genéticamente que expresan un CAR anti-CD19 que comprende un anticuerpo diana que es el anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el reactivo de unión comprende el dominio extracelular del CAR o una porción del mismo que comprende el anticuerpo SJ25C1 o el fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el control positivo incluye un anticuerpo anti-idiotípico como se describe en la subsección I.A.

En algunos casos, la terapia celular es o comprende células modificadas genéticamente que expresan un CAR anti-CD19 que comprende un anticuerpo diana que es el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el reactivo de unión comprende el dominio extracelular del CAR o una porción del mismo que comprende el anticuerpo FMC63 o el fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el control positivo incluye un anticuerpo anti-idiotípico como se describe en la subsección I.B.

En algunos casos, los métodos incluyen detectar si se forma un complejo entre el reactivo de unión y una molécula, por ejemplo, molécula de unión, tal como un anticuerpo, presente en la muestra, y/o detectar la presencia o ausencia o nivel de dicha unión. En determinados casos, el contacto o la incubación se realizan en condiciones que permiten la unión del reactivo de unión a una molécula presente en la muestra del sujeto. En algunos aspectos, el complejo se detecta mediante un inmunoensayo, opcionalmente un ensayo tipo sándwich o puente. Como ejemplos, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), quimioluminiscente, electroquimioluminiscente, biosensor basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, BIAcore), citometría de flujo o transferencia Western. En algunos casos, el inmunoensayo es o incluye el descubrimiento a escala meso.

En algunos aspectos, el inmunoensayo es un ensayo de tipo sándwich o un ensayo de puente. En un ensayo de tipo sándwich o puente, el reactivo de unión es un primer reactivo de unión y detectar la presencia o ausencia de una molécula o un complejo que comprende una molécula incluye poner en contacto el complejo formado entre el primer reactivo de unión y la molécula con un segundo reactivo de unión en el que el segundo reactivo de unión es un agente que puede unirse a la misma molécula o a una molécula similar que el primer reactivo de unión. En algunos casos, el segundo reactivo de unión comprende el dominio extracelular del CAR o una porción del mismo. En algunos aspectos, el dominio extracelular del CAR o porción del mismo del primer agente de unión y del segundo agente de unión es el mismo o sustancialmente el mismo.

En algunos casos, el reactivo de unión, tal como el primer y/o segundo reactivo de unión, está marcado de forma detectable o es capaz de producir una señal detectable. El reactivo de unión, tal como el primer y/o segundo reactivo de unión, se une, directa o indirectamente, a un marcador detectable. En algunos casos, el marcador detectable es o incluye un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroluminiscente, un marcador colorimétrico, un marcador bioluminiscente o un radiomarcador. En algunos casos, el reactivo de unión, como el primer y/o segundo reactivo de unión está unido, directa o indirectamente, a un marcador SULFO-Tag. En algunos casos, al menos uno del primer y segundo reactivo de unión está marcado de forma detectable o es capaz de producir una señal detectable y el otro del primer y segundo reactivo de unión está unido o inmovilizado a un soporte sólido. En algunos aspectos, el primer reactivo de unión está unido o inmovilizado a un soporte sólido o es capaz de unirse o inmovilizarse a un soporte sólido. Los métodos para unir directa o indirectamente un reactivo de unión a un soporte sólido son bien conocidos en la técnica. Los métodos de unión generalmente incluyen la adsorción no específica del reactivo de unión al soporte sólido o la unión covalente del reactivo de unión, típicamente a través de un grupo amino libre, a un grupo químicamente reactivo en el soporte sólido, tal como un grupo carboxilo activado, hidroxilo o aldehído. Los métodos de unión también incluyen la unión indirecta del reactivo de unión al soporte sólido, como por ejemplo recubriendo el soporte sólido con un reactivo de captura, tal como la estreptavidina, y añadiendo reactivos de unión marcados por afinidad, tales como reactivos marcados con biotina, al soporte sólido de modo que la interacción entre el marcador de afinidad (por ejemplo, biotina) y el reactivo de captura (por ejemplo, estreptavidina) une el reactivo de unión al soporte sólido. En algunos casos, el primer reactivo de unión está unido, directa o indirectamente, a una biotina. En algunos ejemplos, el primer reactivo soluble está unido a un soporte sólido recubierto con estreptavidina. En algunos casos, el segundo reactivo de unión está unido, directa o indirectamente, a un marcador detectable, opcionalmente un marcador SULFO-Tag.

En casos particulares, la muestra se pone en contacto con un primer reactivo de unión que está fijado, unido, recubierto y/o conjugado con una superficie o soporte sólido, por ejemplo, una placa o un pocillo. En determinados casos, el primer reactivo de unión se ha fijado, unido, recubierto y/o conjugado con la superficie sólida o soporte mediante la unión indirecta del reactivo de unión al soporte sólido, tal como recubriendo el soporte sólido con un reactivo de captura, tal como la estreptavidina, y añadiendo reactivos de unión marcados por afinidad, tales como reactivos marcados con biotina, al soporte sólido de modo que la interacción entre el marcador de afinidad (por ejemplo, biotina) y el reactivo de captura (por ejemplo, estreptavidina) une el reactivo de unión al soporte sólido. En algunos casos, la muestra se pone en contacto con un segundo reactivo de unión que está unido, directa o indirectamente, a un marcador SULFO-Tag. En casos particulares, el primer y/o segundo reactivo de unión se utiliza en una concentración de entre 10 ng/ml y 100 µg/ml, entre 100 ng/ml y 1,0 µg/ml, entre 250 ng/ml y 10 µg/ml, entre 250 ng/ml y 1 µg/ml, entre 1 µg/ml y 10 µg/ml, entre 250 ng y 2,5 µg/ml, o entre 1 µg/ml y 10 µg/ml del anticuerpo antiidiotipo. En algunos casos, la superficie sólida o soporte se incuba con entre 250 ng/ml y 10 µg/ml. En determinados casos, la superficie sólida o soporte se incuba con o con aproximadamente 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml o 10 µg/ml.

En algunos casos, la muestra de un sujeto al que se le ha administrado una terapia celular que comprende células diseñadas con un receptor de antígeno quimérico es o comprende cualquier muestra de fluido corporal del sujeto. En algunos aspectos, la muestra es o comprende sangre entera, suero o plasma. En algunos casos, la muestra se obtiene del sujeto dentro o alrededor de 1 hora a 1 año después del inicio de la administración de la terapia celular o dosis de células, tal como en un plazo de o aproximadamente en un plazo de 6 horas, 12 horas, 24 horas, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses o doce meses. En algunos aspectos, la muestra se obtiene del sujeto desde aproximadamente 1 mes hasta 6 meses después del inicio de la administración de la terapia celular, tal como de 2 meses a 6 meses o de 2 meses a 4 meses, por ejemplo, de alrededor de o aproximadamente 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 o 6 meses después del inicio de la administración de la terapia celular.

VI. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

También se divulgan artículos de fabricación o kits que contienen los anticuerpos antiidiotipo y/o composiciones divulgados. En algunos casos, se divulgan artículos de fabricación que comprenden un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo se une a un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o a un receptor de antígeno quimérico que comprende un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos ejemplos, el anticuerpo anti-CD19 es SJ25C1 o FMC63. En algunos aspectos, un conjugado que contiene los anticuerpos antiidiotipo descritos en el presente documento se divulga en los artículos de fabricación o kits.

En algunos casos, el kit o artículo de fabricación incluye el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo y un reactivo de unión que contiene el dominio extracelular, o parte de un dominio extracelular, de un receptor de antígeno quimérico (CAR) al que se une el anticuerpo antiidiotipo, tal como se une específicamente. En algunos casos, el dominio extracelular del CAR es o incluye el anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, FMC63 o SJ25C1) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos casos, el reactivo de unión es un primer reactivo de unión y el kit o artículo de fabricación incluye

adicionalmente un segundo reactivo de unión. En dichos ejemplos, el segundo reactivo de unión es un agente que puede unirse a la misma molécula o a una similar que el primer reactivo de unión. En algunos casos, el segundo reactivo de unión comprende el dominio extracelular del CAR o una porción del mismo. En algunos aspectos, el dominio extracelular del CAR o porción del mismo del primer agente de unión y del segundo agente de unión es el mismo o sustancialmente el mismo

En algunos casos, el reactivo de unión, o al menos uno del primer y segundo reactivo de unión, está fijado a un marcador (por ejemplo, un marcador detectable) tal como un marcador descrito en el presente documento. En algunos casos, al menos uno del primer y segundo reactivo de unión está unido a un soporte sólido o es capaz de unirse a un soporte sólido, tal como un soporte sólido descrito en el presente documento. En algunos aspectos, uno del primer y segundo reactivo de unión está marcado de forma detectable o es capaz de producir una señal detectable y el otro del primer y segundo reactivo de unión está unido o inmovilizado a un soporte sólido. En algunos casos, los reactivos de unión se proporcionan como un kit o como parte de un sistema como se describe en otra parte del presente documento para su uso en conexión con un inmunoensayo (por ejemplo, ensayo de tipo sándwich o puente). En algunos casos, el primer reactivo de unión está unido a un soporte sólido, opcionalmente un soporte sólido recubierto de estreptavidina. En algunos casos, la segunda proteína soluble está unida directa o indirectamente a un marcador detectable, tal como SULFO-Tag.

En algunos casos, el kit comprende además un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno. En algunos aspectos, el anticuerpo antiidiotipo se une a un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o a un receptor de antígeno quimérico que comprende un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos ejemplos, el anticuerpo anti-CD19 es SJ25C 1 o FMC63. En algunos casos, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo se describe como una muestra de control positivo. En algunos ejemplos, la muestra de control positivo forma un complejo con la primera y la segunda proteína soluble o reactivo que contiene regiones del dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el anticuerpo CD19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos casos, el kit o artículo del fabricante comprende reactivos o componentes para llevar a cabo cualquiera de los métodos divulgados. En algunos casos, el artículo de fabricación o kit comprende uno o más reactivos u otros materiales deseables desde un punto de vista comercial, terapéutico y del usuario, incluidos los anticuerpos secundarios, marcadores de afinidad, reactivos de captura, tampones, diluyentes, agentes de detección de señales, filtros, agujas, jeringas, tubos capilares e prospectos con instrucciones de uso.

En algunos casos, los kits pueden divulgarse como artículos de fabricación que incluyen materiales de embalaje para el embalaje de los anticuerpos o composiciones de los mismos o de uno o más reactivos adicionales, por ejemplo, reactivos de unión o componentes. Por ejemplo, los kits pueden contener recipientes, frascos, tubos, viales y cualquier material de embalaje adecuado para separar u organizar los componentes del kit.

En algunos casos, el kit incluye uno o más recipientes. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringas (tales como jeringas de una o dos cámaras) y tubos de ensayo. El uno o más recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El uno o más recipientes contienen una composición que comprende un anticuerpo u otros reactivos, por ejemplo, reactivos de unión, para su uso en los métodos. El artículo de fabricación o kit del presente documento puede comprender los anticuerpos o reactivos en recipientes separados o en el mismo recipiente. En algunos casos, el uno o más recipientes que contienen la composición pueden ser un vial de un solo uso o un vial de usos múltiples, que, en algunos casos, puede permitir el uso repetido de la composición reconstituida.

En algunos casos, el artículo de fabricación o kit puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial, terapéutico y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, agentes terapéuticos y/o prospectos con instrucciones de uso.

Los artículos de fabricación pueden incluir un recipiente y un marcador o prospecto sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente en algunos casos contiene una composición que contiene un anticuerpo antiidiotipo como se divulga en el presente documento que es por sí solo o se combina con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar una enfermedad o afección. En algunos casos, el recipiente tiene un puerto de acceso aséptico. Los recipientes de ejemplo incluyen bolsas de solución intravenosa, viales, incluyendo aquellos que tienen tapones perforables con una aguja para inyección. El artículo de fabricación puede incluir un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición incluye el anticuerpo antiidiotipo. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede incluir además otro o el mismo recipiente que comprende un tampón aceptable. Puede incluir además otros materiales tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y/o jeringuillas.

En algunos casos, el artículo de fabricación o kit comprende un soporte sólido, incluyendo un soporte sólido formado de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno,

alcohol polivinílico, nitrocelulosa, celulosa, nailon, siliconas y otros materiales bien conocidos en la técnica que se utilizan en un soporte sólido para la unión directa o indirecta de un reactivo de unión como se describe. Los soportes sólidos incluidos en los artículos de fabricación o kits divulgados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, una perla, columna (por ejemplo, columna de cromatografía, etc.), una matriz (por ejemplo, micromatriz, nanomatriz, etc.), una placa de ensayo, un cartucho, una barra, un filtro, una tira o cualquier otro soporte sólido descrito en el presente documento.

En algunos casos, el artículo de fabricación o kit puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial, terapéutico y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, agentes terapéuticos y/o prospectos con instrucciones de uso.

En algunos casos, el kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones. Las instrucciones generalmente incluyen una expresión tangible que describe los anticuerpos y, opcionalmente, otros componentes incluidos en el kit, por ejemplo, reactivo de unión y métodos para utilizar los anticuerpos y/u otros componentes en o en conjunto con cualquiera de los usos o métodos descritos. En algunos casos, las instrucciones se proporcionan como un marcador o un prospecto, que se encuentra sobre o asociada con el recipiente. En algunos casos, las instrucciones pueden indicar instrucciones para la reconstitución y/o uso de la composición.

En algunos casos, se proporcionan instrucciones para utilizar el anticuerpo antiidiotipo para detectar un anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un receptor de antígeno quimérico que comprende el anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como de acuerdo con o en conjunción con cualquiera de los métodos o ensayos descritos. En algunos ejemplos, se proporcionan instrucciones para utilizar el anticuerpo antiidiotipo para seleccionar o enriquecer, de una población de células, células diseñadas que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos ejemplos, se proporcionan instrucciones para utilizar el anticuerpo antiidiotipo para estimular una composición de entrada que comprende células que expresan un receptor de antígeno quimérico que comprende el anticuerpo SJ25C1 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos casos, se proporcionan instrucciones para utilizar el anticuerpo antiidiotipo para detectar un anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un receptor de antígeno quimérico que comprende el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como de acuerdo con o en conjunción con cualquiera de los métodos o ensayos descritos. En algunos aspectos, se proporcionan instrucciones para utilizar el anticuerpo antiidiotipo para seleccionar o enriquecer, de una población de células, células diseñadas que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, se proporcionan instrucciones para utilizar el anticuerpo antiidiotipo para estimular una composición de entrada que comprende células que expresan un receptor de antígeno quimérico que comprende el anticuerpo FMC63 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos casos, se proporcionan instrucciones para el uso del kit proporcionado para detectar una molécula que se une a un receptor de antígeno quimérico de la terapia celular, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo producido por una respuesta inmunitaria humoral al receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, se proporcionan instrucciones para poner en contacto un reactivo de unión con una muestra de un sujeto al que se le ha administrado una terapia celular que comprende células diseñadas con un CAR que comprende un anticuerpo diana que es el anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, FMC63 o SJ25C1) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el reactivo de unión comprende el dominio extracelular del CAR o una porción del dominio extracelular que comprende el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, las instrucciones también especifican la detección de la presencia o ausencia de un complejo que comprende los reactivos de unión y una molécula de la muestra que se une tanto al primer como al segundo reactivo de unión, opcionalmente en donde la molécula es o comprende un anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo CD19 es SJ25C 1 o FMC63. En algunos casos adicionales, se proporcionan instrucciones para utilizar los reactivos de unión y la muestra de control positivo.

VII. DEFINICIONES

A menos que se defina otra cosa, todos los términos de la técnica, se pretende que las notaciones y otros términos o terminología técnicos y científicos utilizados en el presente documento tengan el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial con respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica.

Como se usa en el presente documento, la referencia a una "forma correspondiente" de un anticuerpo significa que cuando se compara una propiedad o actividad de dos anticuerpos, la propiedad se compara usando la misma forma del anticuerpo. Por ejemplo, si se establece que un anticuerpo tiene mayor actividad en comparación con la actividad de la forma correspondiente de un primer anticuerpo, eso significa que una forma particular, tal como un scFv de ese

anticuerpo, tiene mayor actividad en comparación con la forma scFv del primer anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, cuando se dice que las posiciones de los nucleótidos o de los aminoácidos "corresponden a" posiciones de nucleótidos o de aminoácidos en una secuencia desvelada, como se expone en el listado de secuencias, se entiende que se refiere a las posiciones de los nucleótidos o de los aminoácidos que se han identificado después del alineamiento con la secuencia desvelada para maximizar la identidad, utilizando un algoritmo de alineamiento estándar, tal como el algoritmo GAP. Alineando las secuencias, un experto en la materia puede identificar los residuos correspondientes, por ejemplo, utilizando como guía restos de aminoácidos conservados e idénticos. En general, para identificar las posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de forma que se obtenga la coincidencia de mayor orden (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región carboxiterminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En un caso, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226 o de Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es según el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado", y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos casos, un anticuerpo se purifica hasta una pureza superior al 95 % o 99 % como se determina mediante, por ejemplo, medios electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC en fase inversa). Para una revisión de los métodos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848: 79-87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenido en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo antiidiotipo" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha una o más moléculas de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados y dicha una o más moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula hospedadora.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras", se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula primaria transformada y la descendencia derivada de la misma, independientemente del número de pases. Es posible que la descendencia no sea totalmente idéntica en cuanto al contenido de ácido nucleico a una célula progenitora, sino que puede contener mutaciones. En el presente documento se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originariamente.

Como se usa en el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y "porcentaje de identidad" cuando se usan con respecto a una secuencia de aminoácidos (secuencia de polipéptido de referencia) se definen como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento del sujeto) que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de

secuencia. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando.

Una sustitución de aminoácidos puede incluir la sustitución de un aminoácido en un polipéptido por otro aminoácido. La sustitución puede ser una sustitución de aminoácido conservadora o una sustitución de aminoácido no conservadora. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en una molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo, de interés y se pueden seleccionar los productos para una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad reducida o CCDA o CDC mejoradas.

Los aminoácidos generalmente pueden agruparse de acuerdo con las siguientes propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

En algunos casos, las sustituciones conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector en forma de una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un/uno", "uno/a", "el" y "la", incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, "un" o "uno/a" significa "al menos uno/a" o "uno/a o más". Se entiende que los aspectos y variaciones descritos en el presente documento incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y variaciones.

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos de la materia objeto reivindicada se presentan en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la materia objeto reivindicada. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor afirmado o que interviene en el intervalo comentado queda englobado dentro de la materia objeto reivindicada. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también se incluyen en la materia objeto reivindicada, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o ambos de los límites incluidos también quedan englobados en la materia objeto reivindicada. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. En el presente documento la referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro incluye (y describe) casos que se refieren de por sí a ese valor o parámetro. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluidos los anticuerpos y las cadenas de anticuerpos y otros péptidos proporcionados, por ejemplo, enlazadores, pueden incluir restos de aminoácidos que incluyen restos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. En algunos aspectos, los polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína

mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por la PCR.

- 5 Como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluyendo células. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

- 10 Como se usa en el presente documento, una afirmación de que una célula o población celular es "positiva" para un marcador particular se refiere a la presencia detectable sobre o en la célula de un marcador particular, normalmente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable por citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas y/o en un nivel sustancialmente similar al de la célula que se sabe que es positiva para el marcador y/o a un nivel sustancialmente superior al de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

- 20 Como se usa en el presente documento, una afirmación de que una célula o población celular es "negativa" para un marcador en particular se refiere a la ausencia de presencia sustancial detectable sobre o en la célula de un marcador particular, normalmente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción no es detectada por citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control de isotipo emparejado bajo condiciones idénticas por lo demás, y/o en un nivel sustancialmente menor que el de la célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o en un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

IX. Ejemplos

- 30 Los siguientes ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

35 **Ejemplo 1 Generación de anticuerpos antiidiotipo contra un anticuerpo derivado de la región variable de SJ25C1**

- Este ejemplo describe la generación de anticuerpos antiidiotipo (anti-ID) que reconocen la porción scFv de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR) ilustrativo que contiene un scFv anti-CD19 con regiones de cadena pesada variable y cadena ligera variable derivadas de SJ25C1 (un anticuerpo (en este caso un scFv) que tiene una secuencia de región variable de las SEQ ID NO: 23 y 24 separada por un enlazador establecido en la SEQ ID NO: 25), una porción extracelular derivada de CD28 humano, un dominio transmembrana obtenido de CD28 humano, un dominio de señalización intracelular derivado de CD28 humano, y un dominio de señalización derivado de CD3 zeta humano.

45 **A. Generación de hibridomas y detección de anticuerpos**

- Los ratones fueron inmunizados con una porción del dominio extracelular (ECD) del CAR (que contiene un scFv anti-CD19 con regiones variables derivadas de SJ25C1). La parte ECD contenía la secuencia
 EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGD
 GDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTTV
 50 TVSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQKPGQSP
 KPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGDTFTLTITNVQSKDLADYFCQYNYRYPYTSGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 28) y una parte extracelular de CD28 (SEQ ID NO: 27).

- El suero aislado de ratones inmunizados se analizó mediante ELISA para determinar su capacidad de unirse a la porción ECD soluble recombinante mediante detección con un anticuerpo secundario. Se generaron clones de fusión de hibridoma y se caracterizaron aún más mediante ELISA para su unión al ECD y se seleccionaron cinco (5) clones positivos. Cada clon de hibridoma seleccionado se expandió y se purificaron los anticuerpos. Para permitir la detección del anticuerpo en ensayos posteriores, cada anticuerpo se conjugó con Alexa647.

- 60 Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a los linfocitos T diseñados con el CAR anti-CD19 (derivado de SJ25C1), (evaluado por comparación con la unión a linfocitos T de control transducidos simulados). Las linfocitos T se aislaron mediante enriquecimiento basado en inmunofluorescencia de sujetos humanos y las células se activaron y transdujeron con un vector vírico que codifica el CAR anti-CD19 (derivado de SJ25C1). Se utilizó individualmente una serie de diluciones seriadas dobles (comenzando con 20 µg/ml y diluidas a 0,0195 µg/ml) de cada uno de los anticuerpos antiidiotipo para detectar la expresión superficial del CAR mediante citometría de flujo. Como control positivo, también se evaluaron las células para la expresión superficial del CAR utilizando concentraciones

similares de un anticuerpo de cabra anti-ratón ("GAM") que pudo detectar la porción de la región variable murina de la porción ECD del CAR. También se probó un control sin anticuerpos. La curva dosis-respuesta para el porcentaje de células positivas para la señal Alexa647 en linfocitos T transducidos con el CAR fue similar para cada uno de los anticuerpos antiidiotipo analizados y comparable a la del anticuerpo GAM de control positivo, ninguno de los cuales reconoció linfocitos T simulados transducidos con el vector vacío. El índice de tinción, que es la diferencia entre las medias de los picos positivo y de fondo (simulado) y la dispersión del pico de fondo, de los anticuerpos antiidiotipo y el anticuerpo GAM también se determinó y se encontró que era comparable entre los anticuerpos antiidiotipo y el anticuerpo GAM de control positivo. Se seleccionó el clon A-1 del anticuerpo anti-idiotipo (anti-ID A-1) para una caracterización adicional.

B. Actividad funcional

La fosforilación de Erk1/2 en células Jurkat diseñadas para expresar el CAR descrito anteriormente se evaluó mediante citometría de flujo después de la estimulación con el anticuerpo anti-ID A-1 o un anticuerpo anti-CD3, en cada caso en presencia o ausencia de un anticuerpo reticulante. Después de la incubación, las células se fijaron con formaldehído, se permeabilizaron, se incubaron con un anticuerpo específico para Erk1/2 fosforilado y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 1, tras la incubación de las células en presencia del anticuerpo anti-ID A-1, se observó un aumento en la fosforilación de Erk1/2 a un nivel similar al observado durante la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 en presencia de un agente reticulante. Se observó que ambos anticuerpos inducían grados similares de fosforilación de Erk1/2 incluso en ausencia de reticulación.

Además, se utilizó Western blotting para comparar la fosforilación de Erk en células Jurkat que expresan CAR o células Jurkat parentales que no expresan CAR, tras la estimulación con anti-ID A-1, un control de isotipo o anti-CD3 o en ausencia de estímulo, en presencia o ausencia de un anticuerpo reticulante. Los resultados indicaron que la estimulación con el anticuerpo antiidiotipo aumentó específicamente la fosforilación de Erk1/2 en células Jurkat transducidas con el CAR anti-CD19 (derivado de SJ25C1), pero no en las células Jurkat parentales (en las que sólo se observó señal de fondo, similar a las células no estimuladas y estimuladas con control de isotipo), en un grado similar al inducido por el anticuerpo anti-CD3. En cambio, el anticuerpo anti-CD3 indujo la fosforilación de manera no específica, es decir, tanto en la célula Jurkat que expresa CAR como en la célula Jurkat parental.

C. Identificación de secuencias

Se determinaron las secuencias del anticuerpo anti-ID A-1. Se extrajo el ARN total de células de hibridoma que contenían el clon de hibridoma que expresaba anti-ID A-1 y ADNc utilizando cebadores antisentido específicos de isotipo o cebadores universales utilizando PrimeScript™ 1st Kit de síntesis de ADNc de cadena larga (Takara, n.º cat. 6110A). Se realizó PCR RACE para amplificar las regiones variables (cadenas pesadas y ligeras) y constantes del anticuerpo, que luego se clonaron por separado en un vector de clonación y se secuenciaron. En la Tabla 2 se presentan las SEQ ID NOS correspondientes de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos del anticuerpo.

Tabla 2. Secuencia anti-ID A-1

	Cadena ligera			Cadena pesada		
	Completa	Variable	Constante	Completa	Variable	Constante
Nucleótido	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
Aminoácido	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2

Ejemplo 2 Generación de anticuerpos antiidiotipo contra un anticuerpo derivado de FMC63

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos antiidiotipo que reconocen la porción del dominio de unión (scFv) de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR) ilustrativo que contiene un scFv anti-CD19 con dominios VH y VL derivados de FMC63 (un anticuerpo que contiene las secuencias de cadena pesada variable (VH) y cadena ligera variable (VL) establecidas en las SEQ ID NO: 30 y 31, respectivamente). El scFv se establece en la SEQ ID NO: 34 y contiene las regiones VH y VL separadas por un enlazador establecido en la SEQ ID NO: 33.

A. Generación de hibridomas y detección de anticuerpos

Los ratones fueron inmunizados con una proteína soluble que contenía la porción scFv de este CAR (SEQ ID NO:34), fusionada a un dominio Fc de IgG1 humano (SEQ ID NO:32; la proteína carecía de la región bisagra). El reactivo de proteína soluble utilizado para la inmunización se establece en la SEQ ID NO: 35.

El suero aislado de ratones inmunizados se analizó mediante ELISA para determinar su capacidad de unirse a la porción scFv-Fc. mediante detección con un anticuerpo secundario. Los clones fueron contraseleccionados contra un péptido que contenía sólo el dominio Fc (SEQ ID NO: 32), para seleccionar anticuerpos antiidiotipo que no reaccionaran de forma cruzada con la porción Fc del scFv-Fc utilizado para inmunizar a los ratones. Los clones también

se compararon con un constructo que contenía un scFv derivado de otro anticuerpo CD19, SJ25C1 (secuencias de región variable de las SEQ ID NO: 23 y 24 separadas por el enlazador establecido en la SEQ ID NO: 25), fusionado al dominio Fc sin bisagra (SEQ ID NO: 32) para seleccionar aún más anticuerpos antiidiotipo que no reaccionaran de forma cruzada con un anticuerpo anti-CD19 diferente.

Se generaron clones de fusión de hibridoma y se caracterizaron aún más 12 clones candidatos mediante citometría de flujo. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de sujetos humanos y las células se activaron y transdujeron con un vector viral que codifica el CAR anti-CD19. Para la citometría de flujo, se incubaron aproximadamente 1×10^6 por 100 μ l con 10 μ l de anticuerpo antiidiotipo conjugado con biotina seguido de tinción con estreptavidina conjugada con PE. Como control positivo para la expresión superficial del CAR, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-EGFR para verificar la expresión del marcador de transducción EGFRt, que era un sustituto de la expresión de CAR. Como control simulado, las PBMC se transdujeron con un vector vacío que no expresaba el CAR. Las células fueron seleccionadas en PBMC CD3⁺ CD4⁺/CD8⁺ y se determinó y la señal de fluorescencia. Los resultados mostraron que los anticuerpos antiidiotipo candidatos mostraron una unión específica para el CAR en la superficie de las PBMC. Para confirmar que los anticuerpos eran específicos para el scFv derivado del anticuerpo anti-CD19 derivado de FMC63, se realizaron experimentos similares en células transducidas con un CAR anti-CD19 derivado de SJ25C1 como se describe en el Ejemplo 1. Ninguno de los anticuerpos antiidiotipo candidatos contra un anticuerpo derivado de FMC63 exhibió una unión específica para las células que expresaban un CAR anti-CD19 diferente que contenía un scFv derivado de SJ25C1. Se seleccionaron los clones de anticuerpos antiidiotipo B-1 (anti-ID B-1) y B-2 (anti-ID B-2) para una caracterización adicional.

B. Identificación de secuencias

Se determinaron las secuencias de los anticuerpos anti-ID B-1 y B-2. Se extrajo el ARN total de las células de hibridoma que contenían los clones de hibridoma que expresaban anti-ID B-1 o anti-ID B-2 y se generó ADNc utilizando cebadores antisentido específicos de isotipo o cebadores universales utilizando PrimeScript™, 1st Kit de síntesis de ADNc de cadena larga (Takara, n.º cat. 6110A). Se realizó PCR RACE para amplificar las regiones variables (cadenas pesadas y ligeras) y constantes de los anticuerpos, que luego se clonaron por separado en un vector de clonación y se secuenciaron. En la Tabla 3 se presentan las SEQ ID NOS correspondientes de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de los anticuerpos.

Tabla 3. Secuencias anti-ID B-1 y B-2

	Cadena ligera			Cadena pesada		
	Completa (SEQ ID NO)	Variable (SEQ ID NO)	Constante (SEQ ID NO)	Completa (SEQ ID NO)	Variable (SEQ ID NO)	Constante (SEQ ID NO)
Nucleótido anti-ID B-1	56	54	55	52	50	51
Aminoácido anti-ID B-1	42	40	41	38	36	37
Nucleótido anti-ID B-2	76	75	55	73	71	72
Aminoácido anti-ID B-2	63	62	41	60	58	59

Ejemplo 3 Efecto del anticuerpo antiidiotipo unido a la placa sobre la estimulación de los linfocitos T

Este ejemplo describe los resultados posteriores a la incubación de linfocitos T CAR en presencia del anticuerpo antiidiotipo específico de SJ25C1 (anti-ID A-1) descrito en el Ejemplo 1 o en presencia del anticuerpo antiidiotipo específico de scFv derivado de FMC63 (anti-ID B-1) descrito en el Ejemplo 2.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de sujetos humanos y las células se activaron y transdujeron con un vector vírico que codifica un CAR anti-CD19 que tiene un dominio de unión que incluye un scFv con dominios VH y VL derivados de FMC63 o derivados de SJ25C1. Estos vectores se introdujeron en células para generar linfocitos T diseñados para expresar un CAR que contiene scFv derivado de FMC63 y linfocitos T diseñados para expresar un CAR que contiene scFv derivado de SJ25C1, respectivamente. En el caso del CAR derivado del FMC63, la construcción que codifica el CAR incluía además una secuencia que codificaba un EGFR truncado (EGFRt), que sirvió como marcador sustituto para la transducción y para la expresión de CAR; la región codificante de EGFRt se separó de la secuencia codificante de CAR mediante una secuencia de salto T2A. Las células diseñadas se evaluaron en varios ensayos.

Para estudios de proliferación, los linfocitos T diseñados se marcaron con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) 50 nM o colorante CELL TRACE VIOLET (CTV). Cuando fue relevante, la expresión del marcador sustituto EGFRt se detectó mediante tinción con un anticuerpo anti-EGFR. Las células se sembraron en una cantidad fija de células por pocillo en pocillos previamente recubiertos con 10, 5, 2,5 o 1,25 μ g/ml de OKT3 (anticuerpo anti-CD3) o de

anticuerpos antiidiotipo que reconocen SJ25C1 y FMC63 (anti-ID A-1 y anti-ID B-1, respectivamente) en tampón de carbonato/bicarbonato de sodio (pH 9,0) durante la noche. Las células sembradas en pocillos sin recubrimiento de anticuerpos se incluyeron como controles negativos. Las células se cultivaron durante 4 días y se evaluó su viabilidad, proliferación y expresión de CD69 y CD25.

La proliferación de linfocitos T que expresan CAR anti-CD19 (SJ25C1 o FMC63) se evaluó mediante dilución de colorante utilizando citometría de flujo. El porcentaje de células CD3⁺/CFSE^{bajo} observadas después de la estimulación de linfocitos T que expresan CAR anti-CD19 (SJ25C1) con anti-ID A-1 se muestra en la figura 2A. El porcentaje de células CD3⁺/EGFR⁺/CFSE^{bajo} observadas después de la estimulación de linfocitos T que expresan CAR anti-CD19 (FMC63) con anti-ID B-1 se muestra en la figura 2B. Se observó que la incubación en presencia del anticuerpo anti-ID A-1 específico de scFv derivado de SJ25C1 conducía a la proliferación de linfocitos T que expresaban CAR anti-CD19 (SJ25C1) a niveles comparables a la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 (FIG. 2A). En cambio, la proliferación observada en linfocitos T que expresan CAR anti-CD19 (SJ25C1) incubados en presencia de otro anti-ID específico para un dominio de unión CAR anti-CD19 diferente, el anti-ID B-1 específico del scFv derivado de FMC63 fue similar al observado en células en ausencia de cualquier agente estimulante. De manera similar, se observó que la incubación en presencia del anticuerpo anti-idiotipo específico scFv derivado de FMC63 anti-ID B-1 daba como resultado la proliferación de linfocitos T que expresaban CAR anti-CD19 (dominio de unión derivado de FMC63) a niveles comparables a la estimulación con el anticuerpo anti-CD3. Por el contrario, las células incubadas en presencia de otro anti-ID que reconoce un CAR anti-CD19 diferente (el anticuerpo anti-ID A-1 específico de scFv derivado de SJ25C1) fueron similares a las observadas para las células incubadas en ausencia de agentes estimulantes (Figura 2B). Estos resultados demostraron que cada uno de los anti-ID A-1 y anti-ID B-1 era capaz de estimular e inducir la proliferación de linfocitos T que expresaban un CAR que contenía el scFv respectivo para el cual el anticuerpo era específico, y no indujo la proliferación de linfocitos T que expresaban un CAR diferente dirigido al mismo antígeno pero que no contenía el dominio de unión específico para el cual el anticuerpo era específico. Los resultados son consistentes con la capacidad de los anti-ID A-1 y anti-ID B-1 de reconocer específicamente sus respectivos objetivos y no los CAR que contienen otros dominios de unión contra el mismo antígeno.

Los resultados de otro ensayo confirmaron la capacidad de los anti-ID ilustrativos evaluados en este ensayo para proporcionar una señal CAR-spec a las linfocitos T de una manera específica de concentración de anti-ID, en consonancia con la utilidad de los anti-ID para ajustar la cantidad de señal recibida a través de los linfocitos T que expresan CAR específicos de CD19. En este ensayo, los linfocitos T transducidos simulados y transducidos con CAR se marcaron con CELL TRACE VIOLET (CTV). Antes de sembrar, los pocillos se recubrieron con 0,25, 0,5 o 1 µg/ml de un anticuerpo antiidiotipo ilustrativo específico para el dominio de unión del CAR anti-CD19. Las células se cultivaron durante 4 días y se evaluó la proliferación evaluando el grado de dilución del tinte mediante citometría de flujo. La figura 2C muestra una inducción dependiente de la concentración de antiidiotipo de la proliferación de linfocitos T CAR CD8⁺. Estos resultados demuestran la capacidad de ajustar la cantidad de anticuerpos antiidiotipo ilustrativos unidos a la placa que se proporcionan en el presente documento, por ejemplo, para ajustar la cantidad de señal y/o proporcionar un nivel controlado de estimulación y/u optimizar el grado de estimulación, de los linfocitos T que expresan CAR en diversos contextos.

Para investigar más a fondo la capacidad estimulante de anti-ID A-1 y anti-ID B-1, los linfocitos T transducidos con un CAR anti-CD19 diana (derivado de SJ25C1 o FMC63, respectivamente) se evaluaron mediante citometría de flujo para la expresión de dos marcadores de activación de linfocitos T, CD69 y CD25, después de la estimulación con anticuerpos unidos a la placa en concentraciones que incluyen 1,25, 2,5, 5 y 10 µg/ml. Los linfocitos T transducidos se seleccionaron para EGFR como sustituto de la expresión de CAR, y las células EGFR⁺ CD4⁺ o CD8⁺ se evaluaron para la expresión de CD69 o CD25.

Como se muestra en la figura 3 para los linfocitos T transducidos con un CAR anti-CD19 derivado de SJ25C1, el anti-ID A-1 indujo una mayor expresión de CD25 tanto en linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ que en las células estimuladas con el anticuerpo anti-CD3. El anti-ID A-1 también indujo la expresión de CD69 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en niveles similares o ligeramente menores que cuando las células fueron estimuladas con el anticuerpo anti-CD3. No se observó expresión de CD69 y CD25 en células no estimuladas ni en células tratadas con el anti-ID B-1 específico de scFv derivado de FMC63. Como se muestra en la figura 4 para los linfocitos T transducidos con un CAR anti-CD19 derivado de FMC63, anti-ID B-1 indujo una mayor expresión de CD25 tanto en linfocitos T CD4⁺/EGFR⁺ y linfocitos T CD8⁺/EGFR⁺ que en las células estimuladas con el anticuerpo anti-CD3. En comparación con la estimulación con anticuerpos anti-CD3, la expresión de CD69 también se indujo en niveles mayores con el anticuerpo anti-ID B-1 en linfocitos T CD4⁺/EGFR⁺ y se indujo en niveles similares o ligeramente superiores en linfocitos T CD8⁺/EGFR⁺. La expresión de CD69 fue similar o ligeramente mayor en concentraciones mayores de anticuerpos en linfocitos T CD8⁺/EGFR⁺. No se observó expresión de CD69 y CD25 en células no estimuladas ni en células tratadas con el anticuerpo anti-ID A-1 específico de SJ25C1. Estos resultados indican que tanto el anti-ID A-1 como el anti-ID B-1 fueron capaces de estimular específicamente los linfocitos T que expresaban un CAR que contenía su scFv diana.

Ejemplo 4 Análisis de las respuestas inmunitarias del hospedador específicas del producto transgénico

Se desarrolló un ensayo de anticuerpos antiterapéuticos (ATA) puente para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos, en suero de sujetos tratados, que reconoce los CAR anti-CD19 administrados. Ciertos anticuerpos anti-

ID descritos en los Ejemplos 1-3 se utilizaron como controles positivos y para validar la capacidad del ensayo para detectar la presencia de dichos anticuerpos.

Se utilizó una proteína de fusión Fc humana biotilada (proteína de fusión ECD biotilada), que contiene una porción scFv del CAR con regiones variables derivadas de FMC63 (establecidas en la SEQ ID NO: 34). La proteína de fusión ECD biotilada se añadió a los pocillos recubiertos con estreptavidina; las placas se incubaron en condiciones que permitieran la unión de la proteína de fusión y se lavaron. A los pocillos recubiertos con proteína de fusión biotilada, se añadieron diversas concentraciones de anti-ID B-1 o anti-ID B-2 a los pocillos y se dejaron incubarse en condiciones que permitieran la unión específica del anticuerpo. Después del lavado, una versión marcada con sulfo de la proteína de fusión ECD (proteína de fusión sulfo-ECD) que contiene la fusión Fc-scFv derivada de FMC63. Se lavaron los pocillos y se leyó una señal de electroquimioluminiscencia (ECL) en un Sector Imager Meso Scale Discovery (MSD).

Como se muestra en la figura 5, la señal ECL aumentó a medida que aumentó la concentración de anti-ID B-1 y anti-ID B-2, indicando que el ensayo podría utilizarse para evaluar la presencia o ausencia y los niveles de anticuerpos en muestras de suero, con cualquiera de los anticuerpos anti-ID ilustrativos utilizados como control positivo.

En algunas realizaciones, el ensayo de ATA, utilizando el anticuerpo anti-ID B-1 y/o anti-ID B-2 como control positivo, se utiliza para evaluar la presencia o ausencia de anticuerpos ATA contra CAR en muestras de sujetos que han recibido una infusión de una dosis de una terapia celular que contiene linfocitos T que expresan CAR anti-CD19 (FMC63). En algunos contextos, dicho ATA puede ser potencialmente indicativo de una respuesta inmunitaria humoral del hospedador contra el CAR administrado. En un ensayo ilustrativo, se obtienen muestras de plasma de sujetos en varios puntos temporales, como antes de la infusión y/o los días 14 y 28, y, en algunos casos, a los 3, 6 y/o 12 meses, después del inicio de la administración de la terapia celular. Las muestras derivadas de dichas muestras de plasma se utilizan junto con muestras de control que contienen los anticuerpos anti-ID, en un ensayo como el descrito anteriormente.

También se generó un ensayo de puente similar para evaluar muestras de sujetos que habían recibido una infusión de una dosis de una terapia celular que contenía linfocitos T que expresaban CAR anti-CD19 (SJ25C1). En este ensayo, el anticuerpo anti-ID A-1 se utilizó como control positivo. Se observó que el ensayo tenía una sensibilidad de menos de 100 ng/ml, determinada en función del anticuerpo anti-ID de control positivo y una señal de >4 a 5 veces sobre el fondo plasmático.

Ejemplo 5 Conjugación de anticuerpo antiidiotipo con perlas

El anti-ID B-1 o el anti-ID-B1 como se describe en el Ejemplo 2 se acopló covalentemente a la superficie de perlas magnéticas activadas con tosilo disponibles comercialmente (ThermoFisher, Waltham MA) que son perlas superparamagnéticas, no porosas, monodispersas, tosiloactivadas. Las perlas se unen covalentemente a grupos amino primarios y sulfhidrilo. La conjugación se realizó utilizando perlas que tenían un diámetro de aproximadamente 2,8 μm (designadas M-280) o 4,5 μm (designadas M-450).

Se añadieron 200 μg de anticuerpo anti-ID a aproximadamente 1 ml de perlas activadas con tosilo (por ejemplo, aproximadamente 4×10^9 Perlas activadas con tosilo que tienen un diámetro de 2,8 μm o aproximadamente 4×10^8 perlas tosiloactivadas con un diámetro de 4,5 μm) y el acoplamiento covalente se realizó mediante incubación durante la noche a 37 °C en solución tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0,1 % de albúmina sérica humana (HSA). Las perlas se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS con 0,1 % de HSA. Tras la conjugación, la concentración de perlas se determinó utilizando un cellómetro.

Para evaluar la estabilidad de las perlas conjugadas anti-ID, las perlas se granularon, se extrajo el sobrenadante y se cargó en un gel SDS-PAGE Bis-Tris al 4-12 % y el gel se tiñó con azul de Coomassie. Como control de la proteína total conjugada en las perlas, las perlas granuladas se llevaron a ebullición en un tampón de muestra LDS 4X (dodecil sulfato de litio) a aproximadamente 70 °C durante 20 minutos y aproximadamente 12,5 μl o 25 μl de sobrenadante hervido también se corrieron en un gel SDS-PAGE y se evaluaron con azul de Coomassie. También se evaluaron mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie aproximadamente 2,5 μg o 5,0 μg de anticuerpo anti-ID que no se había conjugado con las perlas (control positivo) o 5 μl de HSA al 0,1 % (control negativo). No se detectó ningún anticuerpo anti-ID en el sobrenadante de las muestras conjugadas que no habían sido hervidas, lo que indica que la conjugación era estable, mientras que el anticuerpo anti-ID se detectó en el sobrenadante de las muestras conjugadas que se llevaron a ebullición.

Ejemplo 6 Evaluación de la estimulación de linfocitos T cultivados con perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo

Las perlas conjugadas anti-ID B-1 específicas de scFv derivados de FMC63 se incubaron con linfocitos T. Los linfocitos T purificados CD3 se aislaron mediante enriquecimiento basado en inmunoafinidad a partir de muestras de leucocitaféresis de donantes sanos. Las células aisladas fueron transducidas con un vector vírico que codifica un CAR anti-CD19 que tiene un scFv derivado de FMC63. La construcción del vector vírico codificó además un EGFR truncado (EGFRt), que sirvió como marcador sustituto de la expresión de CAR; la región codificante de EGFRt se separó de la

secuencia de CAR mediante una secuencia de salto T2A. Después de las transducciones, las células se expandieron en cultivo y se congelaron mediante crioconservación.

Para estudios de estimulación de linfocitos T, las células que expresan CAR CD4+ o CD8+ descongeladas se sembraron por separado a una tasa total de aproximadamente 50 000 células por pocillo. En algunos casos, el medio de cultivo se complementó adicionalmente con citocinas de la siguiente manera: para las células CD4+, aproximadamente 1200 UI/ml de IL-7 recombinante, 20 UI/ml de IL-15 recombinante y 100 UI/ml de IL-2 recombinante; para las células CD8+, aproximadamente 200 UI/ml de IL-2 recombinante y 20 UI/ml de IL-15 recombinante. Se añadieron perlas conjugadas con anti-ID B-1 a las células en una proporción célula:perla de 1:1 o 1:5 y se incubaron hasta 14 días con un intercambio de medio del 50 % cada 2-3 días. Como control positivo, las células se cultivaron con perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28 en una proporción célula:perla de 3:1 en presencia o ausencia de las citocinas indicadas.

En diversos tiempos del cultivo, se evaluaron las células transducidas CD4+ o CD8+ (detectadas mediante anti-EGFR para la expresión del marcador sustituto) para su expansión, expresión de PD-1 y viabilidad.

Como se muestra en las Figuras 6 y 7, la expansión de linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente, se observó cuando las células se cultivaron con perlas conjugadas con anti-ID en una proporción célula:perla de 1:1 o 1:5, particularmente en presencia de citocinas. El grado de expansión fue mayor que cuando las células se cultivaron con las perlas magnéticas de control anti-CD3/anti-CD28.

La expresión superficial de PD-1 en el subconjunto de células CD4+ se evaluó mediante citometría de flujo los días 3, 7, 10 y 14 de cultivo. Como se muestra en la figura 8, la expresión de PD-1 fue alta en células cultivadas con perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, sin embargo, los niveles de PD-1 fueron sustancialmente más bajos o indetectables en las células que se cultivaron con perlas conjugadas con anti-ID.

Como se muestra en la figura 9, el porcentaje de viabilidad de los linfocitos T CD4+ y CD8+ cultivados con una proporción de 1:1 o 1:5 de perlas conjugadas anti-ID o las perlas conjugadas de control anti-CD3/anti-CD28 se mantuvo constantemente alto durante el período de cultivo en el que las células se cultivaron adicionalmente en presencia de citocinas. En todas las condiciones, sin embargo, la viabilidad de las células disminuyó en ausencia de citocinas añadidas, la mayor pérdida de viabilidad celular se produce en los últimos días del cultivo celular.

Ejemplo 7 Evaluación de la producción de citocinas de linfocitos T cultivados con perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo

Los linfocitos T diseñados con un CAR anti-CD19 que tiene un scFv derivado de FMC63 se generaron sustancialmente como se describe en el Ejemplo 6. Los linfocitos T CD8+ descongelados se cultivaron con perlas conjugadas con anti-ID B-1 durante 4 horas en presencia de un inhibidor de Golgi. Los niveles intracelulares de las citocinas TNF α , IFN γ e IL-2 se determinaron mediante citometría de flujo en el CAR subconjunto de linfocitos T CAR⁺ (determinado por tinción de superficie positiva para el marcador de transducción sustituto EGFRt con anti-EGFR) o el subconjunto de linfocitos T CAR⁻ (determinado mediante tinción de superficie negativa para EGFRt con anti-EGFR). Como comparación, los linfocitos T CAR⁺ (EGFR⁺) también se cultivaron con células diana que expresaban CD19 (células K562 transducidas para expresar CD19, K562-CD19) en una proporción de células efectoras:T de 1:2.

Como se muestra en la figura 10A, se indujeron niveles intracelulares de las citocinas TNF α , IFN γ e IL2 en linfocitos T CAR⁺ (EGFRt⁺), pero no en los linfocitos T-CAR (EGFR⁻), cuando las células se cultivaron en presencia de perlas conjugadas anti-ID B-1. En este estudio, el grado de estimulación observado en presencia de perlas conjugadas con anti-ID fue similar a la estimulación de linfocitos T CAR⁺ utilizando células K562-CD19 que expresan antígeno, que es un reactivo de estimulación específico de CAR alternativo (Figura 10B). Estos resultados demostraron que los anti-ID conjugados con perlas son agonistas y estimulan específicamente los linfocitos T que expresan un CAR que tiene un dominio de unión al antígeno reconocido por el anticuerpo anti-ID. Adicionalmente, el reactivo de perlas proporciona un mejor reactivo de estimulación específico de CAR en comparación con las líneas celulares, que requieren cultivo celular y son propensos a una variabilidad de lote a lote.

Ejemplo 8 Evaluación de la expansión después de la reestimulación en serie

La capacidad de las células para expandirse *ex vivo* tras varias estimulaciones pueden ser un sustituto potencial de la capacidad de los linfocitos T CAR⁺ para persistir (por ejemplo, después de la activación inicial) y/o son indicativas de la función *in vivo* (Zhao *et al.* (2015) Cancer Cell, 28:415-28). Los linfocitos T CAR⁺ se generaron como se describió anteriormente y los linfocitos T que expresaban CAR CD4+ o CD8+ descongelados se sembraron por separado a 50 000 células CAR⁺ por pocillo. Se añadieron perlas conjugadas con anti-ID B-1 a las células en una proporción célula:perla de 1:1 o 1:5 en presencia o ausencia de citocinas como se describe en el Ejemplo 6. Como control, se añadieron perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28 a las células en una proporción célula:perla de 3:1 en presencia o ausencia de citocinas. Las células se recolectaron cada 3 o 4 días y se contaron, y se volvieron a estimular con nuevas células objetivo utilizando las mismas condiciones de cultivo después de restablecer el número de células a la densidad de siembra inicial para cada ronda. Se realizaron un total de 4 rondas de estimulación durante un período de cultivo

de 14 días. Para cada ronda de estimulación, se determinó el número de duplicaciones.

Como se muestra en la figura 11, se observó una expansión celular continua de células CD4+ que expresan CAR (EGFR+) después de la reestimulación con perlas conjugadas con anti-ID, aunque el grado de expansión fue mayor cuando las células se cultivaron en presencia de citocinas. Asimismo, el grado de expansión fue mayor que cuando las células se cultivaron con perlas anti-CD3/anti-CD28. Para los linfocitos T CD8+, se observó una cinética de expansión similar cuando las células se cultivaron en presencia de perlas conjugadas con anti-ID o perlas anti-CD3/anti-CD28, aunque la expansión fue algo mayor cuando las células se cultivaron con perlas conjugadas con anti-ID, particularmente en ausencia de citocinas recombinantes añadidas.

Ejemplo 9 Análisis adicional de la expansión celular específica de CAR utilizando perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo

Se realizaron estudios similares a los descritos en los Ejemplos 7 y 8, excepto el uso de linfocitos T que expresan CAR generados a partir de dos donantes de pacientes diferentes. Los linfocitos T purificados con CD3 se aislaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de dos pacientes donantes, se transdujeron con un vector vírico que codifica un CAR anti-CD19 que tiene un scFv derivado de FMC63, se expandieron en cultivo, se congelaron y se descongelaron.

Los linfocitos CD4+, CD8+ descongelados o los cocultivos de CD4/CD8 (proporción 1:1) se sembraron en pocillos de una placa de 6 pocillos a aproximadamente 5×10^6 células totales/pocillo en medio de cultivo que se complementó adicionalmente con citocinas de la siguiente manera: para las células CD4+ o los co-cultivos CD4+/CD8+, el medio se complementó con aproximadamente 1200 UI/ml de IL-7 recombinante, 20 UI/ml de IL-15 recombinante y 100 UI/ml de IL-2 recombinante; para las células CD8+ el medio se complementó con 200 UI/ml de IL-2 recombinante y 20 UI/ml de IL-15 recombinante. Se añadieron perlas conjugadas con anti-ID B-1 a las células en una proporción célula:perla de 1:1 y se incubaron hasta 9 días con un intercambio de medio del 50 % cada 2-3 días.

En diversos tiempos del cultivo, se evaluó el número de células transducidas CD4+ o CD8+ (detectadas por anti-EGFR para la expresión del marcador sustituto) presentes en el cultivo para cada condición y se determinó la expansión o frecuencia de las células que expresaban CAR como porcentaje del total de células. También se determinó la expresión de PD-1 y CD25 y la viabilidad celular.

Como se muestra en la figura 12A, se observó una expansión de más de 60 veces de las linfocitos T CD4+ que expresaban CAR (EGFRt+) cuando las células CD4+ se cultivaron solas con perlas conjugadas con anti-ID. Para los linfocitos T CD8+, se produjo una expansión sustancialmente mayor de linfocitos T CD8+ que expresaban CAR (EGFRt+) en presencia de perlas conjugadas con anti-ID cuando los linfocitos T CD8+ se cocultivaron con células CD4+. Como se muestra en la figura 12B, la frecuencia de CD4+ o CD8+ que expresaban CAR (EGFRt+) aumentó durante los 9 días de cultivo en presencia de las perlas conjugadas con anti-ID con >90 % de células transducidas (EGFRt+) presentes en el cultivo el día 9. La viabilidad de las células CD4+ y CD8+ también se mantuvo cercana al 100 % durante el cultivo, con una viabilidad ligeramente mayor de los linfocitos T CD8+ observada cuando se co-cultivan con linfocitos T CD4+ (Figura 12C). Se observaron resultados similares para ambos donantes.

La expresión superficial de PD-1 y CD25 en células CD4+ o CD8+ transducidas (EGFRt+) se evaluó mediante citometría de flujo los días 5, 7 y 9 de cultivo con las perlas conjugadas con anti-ID. Como se muestra en la figura 13A, la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD4+ y CD8+ disminuyó sustancialmente con el tiempo en cultivos con perlas conjugadas con anti-ID. Como se muestra en la figura 13B, la expresión de CD25 también disminuyó después de 9 días de cultivo en presencia de perlas conjugadas con anti-ID. Se observaron resultados similares para ambos donantes.

Ejemplo 10 Comparación de los niveles de citocinas y el fenotipo después del cultivo con perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo

Los linfocitos T purificados con CD3 se aislaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de dos pacientes donantes, se transdujeron con un vector vírico que codifica un CAR anti-CD19 que tiene un scFv derivado de FMC63 y expandido en cultivo con perlas recubiertas de anticuerpos anti-CD3 y CD28. Después de la expansión, las linfocitos T expandidos se congelaron mediante crioconservación. Para los estudios, los linfocitos T congelados se descongelaron y se evaluaron los niveles de citocinas intracelulares o el fenotipo de superficie de las linfocitos T CD4+ y CD8+ (d = 0) o los linfocitos T CD4+ descongelados, los linfocitos T CD8+ o CD4+/CD8+ co-cultivados se cultivaron durante 9 días adicionales en presencia de perlas conjugadas con anti-ID B-1 antes de evaluar los niveles de citocinas intracelulares y el fenotipo del marcador de superficie después de la estimulación con PMA/ionomicina o células K562 transducidas con CD19 (d = 9).

Para evaluar los niveles de citocinas intracelulares, se añadió inhibidor de Golgi durante 4 horas y luego se evaluaron TNF α , IFN γ e IL-2 mediante citometría de flujo. Para todas las condiciones, el grado de expresión de citocinas intracelulares fue sustancialmente mayor cuando las células fueron estimuladas con PMA/ionomicina en comparación con la estimulación específica de CAR con células K562 transducidas con CD19. Como se muestra en la figura 14A,

los niveles de las citocinas TNF α e IL-2 fueron similares en las células CD4+ o CD8+ inmediatamente después de la descongelación en comparación con las células CD4+ o CD8+ correspondientes o los cocultivos de linfocitos T CD4/CD8, se cultivaron posteriormente en presencia de perlas conjugadas con anti-ID durante 9 días. Se observaron niveles aumentados de IFN γ en los linfocitos T cd4+, cd8+ o los concultivos de linfocitos T CD4/CD8 que se cultivaron posteriormente en presencia de perlas conjugadas con anti-ID durante 9 días en comparación con el nivel de IFN γ en linfocitos T CD4+ o CD8+ inmediatamente después de la descongelación. Estos resultados demostraron que la función de los linfocitos T se mantuvo después de 9 días de expansión con perlas conjugadas con anti-ID. Se obtuvieron resultados similares en células de los dos donantes.

La expresión superficial del marcador de activación CD25, la expresión superficial de los receptores inhibidores PD-1 y LAG-3 y la expresión nuclear del marcador de proliferación Ki-67 también se evaluaron en células CD4+ o CD8+ inmediatamente después de la descongelación (d = 0) o en linfocitos T CD4+ o CD8+ expandidos solos o como un cocultivo CD4/CD8 durante 9 días adicionales en presencia de las perlas conjugadas anti-ID (d = 9). Como se muestra en la figura 14B, se observó expresión reducida de CD25, pero no Ki-67, en células que se cultivaron además en presencia de perlas conjugadas con anti-ID durante 9 días en comparación con los linfocitos T inmediatamente después de la descongelación. La expresión reducida de CD25 fue sustancialmente mayor en las células CD8+ que en las células CD4+. Además, también se observó una disminución de la expresión de PD-1 y LAG-3 en células CD4+ y CD8+ cultivadas solas o como cocultivo CD4/CD8 después de la incubación durante 9 días con perlas conjugadas con anti-ID en comparación con la expresión en células inmediatamente después de la descongelación. Este resultado demostró que después de la incubación con las perlas conjugadas anti-ID, las células transducidas previamente congeladas conservaron su capacidad funcional, como lo demuestra el alto porcentaje de células que fueron positivas para el marcador Ki-67, indicativo de proliferación celular, pero también exhibieron un estado de activación diferente caracterizado por la baja expresión de superficie para el marcador de activación CD25 y los marcadores del receptor inhibidor PD-1 y LAG-3.

Ejemplo 11 Detección de células que expresan CAR con anticuerpos antiidiotipo.

Se generaron composiciones de linfocitos T que contenían linfocitos T-CAR que expresaban un CAR anti-CD19 que contenía un scFv anti-CD19 con regiones variables derivadas del anticuerpo FMC63, un espaciador de inmunoglobulina, un dominio transmembrana derivado de CD28, una región coestimuladora derivada de 4-1BB, y un dominio de señalización intracelular CD3-zeta. La construcción vírica que codifica el CAR codificó además un marcador sustituto EGFRt que estaba separado de la secuencia CAR por una secuencia de salto T2A.

Las células que expresan CAR anti-CD19 se añadieron a una muestra de células que contenían células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) sanas. Las composiciones celulares resultantes se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-ID B1 o anti-ID B2 específicos del scFv anti-CD19 FMC63. Como control, también se incubaron muestras de cada condición con una concentración de anticuerpo anti-EGFR, capaz de detectar el marcador sustituto EGFRt en las células transducidas. Las muestras de control incluyeron aquellas que solo contenían PBMC sin la adición de linfocitos T que expresaban CAR. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia media geométrica (IFM) en células marcadas positivamente para evaluar la tinción de anticuerpos.

Como se muestra en la figura 15A, ambos anticuerpos antiidiotipo detectaron los linfocitos T con el CAR anti-CD19 que tenía un scFv con regiones variables derivadas de FMC63, de manera dependiente de la concentración. Como se muestra en la figura 15B, los anticuerpos anti-ID B1 y anti-ID B2 detectaron células positivas en las composiciones que contenían células que expresaban CAR y no en composiciones que contenían solo PBMC. La tinción para EGFRt indicó que la proporción de células que expresaban el transgén con respecto a las PBMC fue consistente en todas las condiciones. Los resultados confirmaron la capacidad de los anticuerpos anti-ID B1 y anti-ID B2 para detectar específicamente células que expresan CAR anti-CD19 FMC63 scFv, incluso entre muestras que contenían PBMC humanos que no expresaban un CAR. Los resultados son consistentes con una interpretación de que los anticuerpos antiidiotipo pueden usarse para detectar células que expresan CAR en muestras de sujetos a los que se les han administrado células que expresan CAR reconocidas por los anticuerpos, como muestras de sangre periférica recogidas de sujetos humanos, por ejemplo para medir la expansión, el tráfico y/o la persistencia de dichas células a lo largo del tiempo en diversos tejidos y/o fluidos del sujeto.

SECUENCIAS

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
1	QVQLQQPGSELVRPGSVKLSCKASDYTFSTSYWMHWVRQRPQG GLEWIGNIYPGSGGTNYDEKFKRKATLTVDTSSTAYMQLRSLTS EDSAVYYCTREVTTVAYYYSM DYWGQGSTVTVSS	VH anti-ID

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
2	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASST KVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVTC VVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSL SHSPGK	CH anti-ID
3	QVQLQQPGSELVRPGGSVKLSCKASDYFTSYWMHWVRQRPQG GLEWIGNIYPGSGGTNYDEKFKRKATLTVDTSSTAYMQLRSLTS EDSAVYYCTREVTTVAYYYSM DYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYP LAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPA VLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVTCVVVDISKDDP EVQFSWFVDDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSEL PIMHQDWLN GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFV YSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	cadena pesada anti-ID
4	MGWSSILFLVATASGVHS	secuencia señal de HC anti-ID
5	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVK LLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGK TVPFTFGSGTKLEIK	VL anti-ID
6	RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNNYTCEAT HKTSTSPIVKSFNNEC	CL anti-ID
7	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVK LLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGK TVPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNF YPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTK DEYERHNNYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC	cadena ligera anti-ID
8	MMSSAQFLGLLLCFQGTRC	secuencia señal de LC anti-ID
9	SYWMH	CDR1 de HC anti-ID
10	NIYPGSGGTNYDEKFKR	CDR2 de CH anti-ID
11	EVTTVAYYYSM DY	CDR3 de HC anti-ID
12	RASQDISNYLN	CDR1 de LC anti-ID
13	YTSRLHS	CDR2 de LC anti-ID
14	QQGKTVPFT	CDR3 de LC anti-ID
15	CAGGTCCAAGTCAACAACCTGGGTCTGAGCTGGTGAGGCCTG GAGGTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGACTACACTTTC ACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGGACAA GGCCTTGAGTGGATTGGAATATTTATCCTGGTAGTGGTGGTA CTAACTACGATGAGAAGTTCAAGAGGAAGGCCACACTGACTGT AGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCCGCAGCCTG ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAGAGGTTA CTACAGTAGCTTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA	VH anti-ID

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
16	<p>GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGAT CTGCTGCCCCAACTAACTCCATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGT CAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCT GGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCCTGCA GTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCCTCCA GCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCC GGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGA TTGTGGTTGTAAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCAT CTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATT ACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCA AGGATGATCCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGT GGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTT CAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACC AGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACA GTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC CAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCT CCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGC ATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGC AGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGC CCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCT CAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTTAC CTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAG AAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA</p>	CH anti-ID
17	<p>CAGGTCCAACCTGCAACAACCTGGGTCTGAGCTGGTGAGGCCTG GAGGTTCACTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGACTACACTTTC ACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGGACAA GGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTTATCCTGGTAGTGGTGGTA CTAACTACGATGAGAAGTTCAGAGGAAGGCCACACTGACTGT AGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCCGCAGCCTG ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAGAGGTTA CTACAGTAGCTTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCT GTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCCAT GGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCA GTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGC ACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGC AGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCG TCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAGGTGGA CAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAAGCCTTGCATA TGTACAGTCCCAAGATATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAA GCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCAAG TGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGT TCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGAC GCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTC AGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGG AGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCGAAGGCTCC ACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAG GATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTG AAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGG AGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTC TACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGG GAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCC TGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGG TAAATGA</p>	cadena pesada anti-ID
18	<p>ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCCTC AGGTGTCCACTCC</p>	secuencia señal de HC anti-ID

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
19	GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCT GGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACAT TAGCAATTATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACT GTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTAACTCAGGAG TCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTAC TTTTGTCAGCAGGGTAAAACGGTTCCATTACGTTTCGGCTCGG GGACAAAGTTGGAAATAAAA	VL anti-ID
20	CGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAG TGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGA ACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGA TGGCAGTGAACGACAAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGAT CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTC ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAACCTATACCT GTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAG CTTCAACAGGAATGAGTGTTAG	CL anti-ID
21	GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCT GGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACAT TAGCAATTATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACT GTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTAACTCAGGAG TCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTAC TTTTGTCAGCAGGGTAAAACGGTTCCATTACGTTTCGGCTCGG GGACAAAGTTGGAAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGT ATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGT GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACAT CAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAAATGG CGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACC TACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATG AACGACATAACAACCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATC AACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG	cadena ligera anti-ID
22	ATGATGTCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTT CAAGGTACCAGATGT	secuencia señal de LC anti-ID
23	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQG LEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSE DSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTITVTVSS	VH de SJ25C1
24	DIETQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSP KPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQQ YNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL de SJ25C1
25	GGGSGGGSGGGGS	Enlazador
26	GGGGS	Enlazador 4GS
27	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP	Una porción extracelular de CD28
28	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQG LEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSE DSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSG GGGSDIETQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQK GQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADY FCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv de SJ25C1
29	GGGS	Enlazador 3GS
30	EVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	VH de FMC63

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
31	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGKLEIT	VL de FMC63
32	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc de IgG1 sin bisagra
33	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Enlazador
34	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQGSTVTVSS	scFv de FMC63
35	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQGSTVTVSSPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	Reactivo FMC63
36	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYYMKWVKQCHGK SLEWIGDINPNNGGTDYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTS EDSAVYYCAREGNNYGSRDAMDYWGQGSTVTVSS	VH anti-ID B-1
37	AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASST KVDKKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLS PIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGK	CH anti-ID B-1
38	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYYMKWVKQCHGK SLEWIGDINPNNGGTDYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTS EDSAVYYCAREGNNYGSRDAMDYWGQGSTVTVSSAKTTAPSVY PLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR GPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD VSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPE EEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS RTPGK	Cadena pesada de anti-ID B-1
39	MGWSWIFLFLSGTAGVLS	secuencia de señal de HC anti-ID B-1
40	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSGVITYMYWYQQKPRSSPKP WYLTSLNLSGVPARFSGSGSGTSYSLSLTSSMEAEADAATYYCQQW SSNPLTFGAGTKLELK	VL anti-ID B-1

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
41	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSSSTLTLTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFNRECE	CL anti-ID B-1
42	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSGVIYMYWYQQKPRSSPKP WIYLTSLNASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQW SSNPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSSSTLTL TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE	Cadena ligera anti-ID B-1
43	MDFQVQIFSFLMSASVIMSRG	secuencia señal de LC anti-ID B-1
44	DYYMK	CDR1 de HC anti-ID B-1
45	DINPNNGGTDYNQNFKG	CDR2 de HC anti-ID B-1
46	EGNNYGSRDAMDY	CDR3 de HC anti-ID B-1
47	SASSGVIYMY	CDR1 de LC anti-ID B-1
48	LTSNLAS	CDR2 de LC anti-ID B-1
49	QQWSSNPLT	CDR3 de LC anti-ID B-1
50	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG GGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGTAAAGGCTTCTGGATACACATT CACTGACTACTACATGAAGTGGGTGAAGCAGTGTTCATGGAAAG AGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAACAATGGTGGTA CTGACTACAACCAGAACTTTAAGGGCAAGGCCACATTGACTGT AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTG ACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGGGA ATAACTACGGTAGTAGAGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACGTCAGTCACCGTCTCCTCA	VH anti-ID B-1
51	GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGT GTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGT CAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCT GGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCA GTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGAACCTCG AGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACC CGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAG GGCCCAACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAAATGCCAGCACC TAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGA TCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGT GTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCA GCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACA AACCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGT GCCCTCCCCATCCAGCACAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGT TCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCAGCGCCCATCGA GAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACA GGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAA CAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAG ACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAA ACTACAAGAACTGAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCTTA CTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGT GGAAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAAGTGGTCCACGAGGGTCTG CACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTA AA	CH anti-ID B-1

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
52	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG GGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGTAAAGGCTTCTGGATACACATT CACTGACTACTACATGAAGTGGGTGAAGCAGTGTGATGGAAAG AGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAACAAATGGTGGTA CTGACTACAACCAGAACTTTAAGGGCAAGGCCACATTGACTGT AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTG ACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGGGA ATAACTACGGTAGTAGAGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACGTCACTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCG GTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTC GGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCA GTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGC ACACCTTCCCAGCTGTCTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGC AGCTCAGTGACTGTAACTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCA TCACCTGCAATGTGGCCCAACCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGA CAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTCT CCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCG TCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCC CTGAGCCCCATAGTACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGG ATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGA AGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAA CAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCCAG GACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAAC AAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCA AAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCCTCCACC AGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCAT GGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACC AACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCA GTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAG AGTGGAAGAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTG TTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACACACGACTAAG AGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA	Cadena pesada de anti-ID B-1
53	ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCTTGTGTCAGGAACTGC AGGTGTCTCTCT	secuencia de señal de HC anti-ID B-1
54	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCACTCATGTCTGCATCTCC AGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAGGTGTA ATTTACATGTACTGGTACCAACAGAAGCCAAGATCCTCCCCCA AACCTGGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAC AATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGC CAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGCACCA AGCTGGAGCTGAAA	VL anti-ID B-1
55	CGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAG TGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGA ACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGA TGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGAT CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTC ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCT GTGAGGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAG CTTCAACAGGAATGAGTGT	CL anti-ID B-1

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
56	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCACTCATGTCTGCATCTCC AGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAGGTGTA ATTTACATGTACTGGTACCAACAGAAGCCAAGATCCTCCCCCA AACCCTGGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAC AATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGC CAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGCACCA AGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCAT CTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCA GTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGT CAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAAATGGCGTCCT GAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAG CATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGA CATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTT CACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT	Cadena ligera anti-ID B-1
57	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATGAGTGC CTCAGTCATAATGTCCAGGGGA	secuencia señal de LC anti-ID B-1
58	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKTSYGYSFTRYWMNWVKQRPGQ GLEWIGMIHPDSETRLNQKFKDKATLTVDNSSSTAYMQLSSPTS EDSAVYYCASIYYEEAWGQGLVTVSA	VH anti-ID B-2
59	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASST KVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTC VVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSL SHSPGK	CH anti-ID B-2
60	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKTSYGYSFTRYWMNWVKQRPGQ GLEWIGMIHPDSETRLNQKFKDKATLTVDNSSSTAYMQLSSPTS EDSAVYYCASIYYEEAWGQGLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAA QTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL YTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSW FVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCM ITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQK KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	Cadena pesada de anti-ID B-2
61	MGWSSILFLVATATGVHS	secuencia de señal de HC anti-ID B-2
62	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQ LLVYNAKTLADSVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHF WSTPYTFGGGTKLEIK	VL anti-ID B-2
63	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQ LLVYNAKTLADSVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHF WSTPYTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT TKDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKSFNRNEC	Cadena ligera anti-ID B-2
64	MSVLTQVLALLLLWLTGARC	secuencia señal de LC anti-ID B-2
65	RYWMN	CDR1 de HC anti-ID B-2
66	MIHPDSETRLNQKFKD	CDR2 de HC anti-ID B-2
67	IYYEEA	CDR3 de HC anti-ID B-2

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
68	RASGNIHNYLA	CDR1 de LC anti-ID B-2
69	NAKTLAD	CDR2 de LC anti-ID B-2
70	QHFWSTPYT	CDR3 de LC anti-ID B-2
71	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTG GAGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGACTTCTGGCTACTCCTTC ACCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAA GGCCTTGAGTGGATTGGCATGATTCATCCTTCCGATAGTGAAA CTAGGTTAAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGT AGACAATTCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCCCG ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGCATCTACTA TGAAGAGGCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	VH anti-ID B-2
72	GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGAT CTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGT CAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCT GGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTCTGCA GTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTTCCA GCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCC GGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGA TTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCAT CTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATT ACTCTGACTCCTAAGGTACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCA AGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGT GGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTT CAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACC AGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACA GTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC CAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCT CCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGC ATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGC AGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACAACCTCAGC CCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCT CAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTAC CTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAG AAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAA	CH anti-ID B-2

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
73	<p>CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTG GAGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGACTTCTGGCTACTCCTTC ACCAGGTACTGGATGAAC TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAA GGCCTTGAGTGGATTGGCATGATTCATCCTTCCGATAGTGAAA CTAGGTTAAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGT AGACAATTCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCCG ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGCATCTACTA TGAAGAGGCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGAT CTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGT CAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCT GGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCA GTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCA GCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCC GGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGA TTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAAGTATCAT CTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGTCTACCATT ACTCTGACTCCTAAGGTCAAGTGTGTGTGTGGTAGACATCAGCA AGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGT GGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTT CAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTTCCCATCATGCACC AGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACA GTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC CAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCACCT CCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGC ATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGC AGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACAACCTCAGC CCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCT CAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTTAC CTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAG AAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAA</p>	Cadena pesada de anti-ID B-2
74	<p>ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTAC AGGTGTCCACTCC</p>	secuencia de señal de HC anti-ID B-2
75	<p>GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGT GGGAGAACTGTCAACCATCACATGTGAGCAAGTGGGAATATT CACAATTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTC CTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGATAGTGT GCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCT CTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATT ACTGTCAACATTTTTGGAGTACTCCGTACACGTTCCGAGGGGG GACCAAGCTGGAAATAAAA</p>	VL anti-ID B-2
76	<p>GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGT GGGAGAACTGTCAACCATCACATGTGAGCAAGTGGGAATATT CACAATTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTC CTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGATAGTGT GCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCT CTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATT ACTGTCAACATTTTTGGAGTACTCCGTACACGTTCCGAGGGGG GACCAAGCTGGAAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA TCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTG CCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATC AATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGC GTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCT ACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGA ACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCA ACTTACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT</p>	Cadena ligera anti-ID B-2

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
77	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCTGGCGTTGCTGCTGCTGCTGGCT TACAGGTGCCAGATGT	secuencia señal de LC anti-ID B-2
78	DYTFTSY	CDR1 de HC anti-ID
79	DYTFTSYWMH	CDR1 de HC anti-ID
80	TSYWMH	CDR1 de HC anti-ID
81	YPGSGG	CDR2 de CH anti-ID
82	NIYPGSGGTN	CDR2 de CH anti-ID
83	WIGNIYPGSGGTN	CDR2 de CH anti-ID
84	TREVTTVAYYYMSD	CDR3 de HC anti-ID
85	SNYLNWY	CDR1 de LC anti-ID
86	LLIYYTSRLH	CDR2 de LC anti-ID
87	QQGKTVPF	CDR3 de LC anti-ID
88	GYTFTDY	CDR1 de HC anti-ID B-1
89	GYTFTDYMK	CDR1 de HC anti-ID B-1
90	TDYYMK	CDR1 de HC anti-ID B-1
91	NPNNGG	CDR2 de HC anti-ID B-1
92	DINPNNGGTD	CDR2 de HC anti-ID B-1
93	WIGDINPNNGGTD	CDR2 de HC anti-ID B-1
94	AREGNNGSRDAMD	CDR3 de HC anti-ID B-1
95	IYMYWY	CDR1 de LC anti-ID B-1
96	PWIYLTSLA	CDR2 de LC anti-ID B-1
97	QQWSSNPL	CDR3 de LC anti-ID B-1
98	GYSFTRY	CDR1 de HC anti-ID B-2
99	GYSFTRYWMN	CDR1 de HC anti-ID B-2
100	TRYWMN	CDR1 de HC anti-ID B-2
101	HPSDSE	CDR2 de HC anti-ID B-2
102	MIHPDSETR	CDR2 de HC anti-ID B-2
103	WIGMIHPDSETR	CDR2 de HC anti-ID B-2
104	ASIYYEE	CDR3 de HC anti-ID B-2
105	HNYLAWY	CDR1 de LC anti-ID B-2
106	LLVYNAKTLA	CDR2 de LC anti-ID B-2
107	QHFWSTPY	CDR3 de LC anti-ID B-2
108	GYX ₃ FX ₅ X ₆ YX ₈ MX ₁₀ X ₃ = T o S; X ₅ = T o S; X ₆ = D o R; X ₈ = Y o W;	Consenso CDR1 de HC

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
	X ₁₀ = K o N	
109	WIGX ₄ IX ₆ PX ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ TX ₁₃ X ₁₄ NQX ₁₇ FKX ₂₀ X ₄ = D o M; X ₆ = N o H; X ₈ = N o S; X ₉ = N o D; X ₁₀ = G o S; X ₁₁ = G o E; X ₁₃ = D o R; X ₁₄ = Y o L; X ₁₇ = N o K; X ₂₀ = G o D	Consenso CDR2 de HC
110	AX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅	Consenso CDR3 de HC
	X ₂ = R o S; X ₃ = E o I; X ₄ = G o Y; X ₅ = N o Y; X ₆ = N o E; X ₇ = Y o nulo; X ₈ = G o nulo; X ₉ = S o nulo; X ₁₀ = R o nulo; X ₁₁ = D o nulo; X ₁₂ = A o nulo; X ₁₃ = M o nulo; X ₁₄ = D o E; X ₁₅ = Y o A	
111	X ₁ AX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ YX ₁₀ X ₁₁ WY X ₁ = S o R; X ₃ = S o R; X ₄ = S o G; X ₅ = G o N; X ₆ = V o I; X ₇ = I o H; X ₈ = N o nulo; X ₁₀ = M o L; X ₁₁ = Y o A	Consenso CDR1 de LC
112	X ₁ X ₂ X ₃ YX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ LAX ₁₁	Consenso CDR2 de LC

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
	$X_1 = P \text{ o } L;$ $X_2 = W \text{ o } L;$ $X_3 = I \text{ o } V;$ $X_5 = L \text{ o } N;$ $X_6 = T \text{ o } A;$ $X_7 = S \text{ o } K;$ $X_8 = N \text{ o } T;$ $X_{11} = S \text{ o } D$	
113	$QX_2X_3X_4X_5X_6PX_8T$ $X_2 = Q \text{ o } H;$ $X_3 = W \text{ o } F;$ $X_4 = S \text{ o } W;$ $X_5 = S \text{ o } W;$ $X_6 = N \text{ o } T;$ $X_8 = L \text{ o } Y$	Consenso CDR3 de LC
114	SYWMN	CDR1 de HC de SJ25C1
115	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR2 de HC de SJ25C1
116	KTISSVVDIFYFDY	CDR3 de HC de SJ25C1
117	KASQNVGTNVA	CDR1 de LC de SJ25C1
118	SATYRNS	CDR2 de LC de SJ25C1
119	QQYNRYPYT	CDR3 de LC de SJ25C1
120	DYGVS	CDR1 de HC de FMC63
121	VIWGSETTYNSALKS	CDR2 de HC de FMC63
122	HYYYGGSYAMDY	CDR3 de HC de FMC63
123	RASQDISKYLN	CDR1 de LC de FMC63
124	HTSRLHS	CDR2 de LC de FMC63
125	QQGNTLPYT	CDR3 de LC de FMC63
126	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
127	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
128	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
129	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
130	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
131	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
132	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVS DYFTTSY GVHWVRQSPGKGLEWLGVI YPGSGG TDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCAR EVTTVAYYYYSMDY WGQGLTVTVSA TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadena pesada anti-SJ25C1 humanizada ilustrativa
133	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSC RASQDISNYLN WYQRTNGSPRLLIK YTSRLHS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQGKTVPT FGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	Cadena ligera anti-SJ25C1 humanizada ilustrativa
134	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSL TSYWMH WVRQSPGKGLE WIGNIYPGSGGTN YNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYC TREVTTVAYYYYSMD YWGQGLTVTVSA TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadena pesada anti-SJ25C1 humanizada ilustrativa
135	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSI SNYLNWY QQRTNGSPR LLIYYTSRLH SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQGKTVPT TFGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	Cadena ligera anti-SJ25C1 humanizada ilustrativa
136	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT SYWMH WVRQSPGKGLEWLG NIYPGSGGTNYDEKFKR RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCAR EVTTVAYYYYSMDY WGQGLTVTVSA TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadena pesada anti-SJ25C1 humanizada ilustrativa
137	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSC RASQDISNYLN WYQRTNGSPRLLIK YTSRLHS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQGKTVPT FGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	Cadena ligera anti-SJ25C1 humanizada ilustrativa

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
138	<p>QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVS GYTFTDY GVHWVRQSPGKGLEWLGVI NPNNGG TDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCAR EGNNYGSRDAMDY WGQGLTLTVSA</p> <p>TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Cadena pesada anti-FMC63 humanizada ilustrativa
139	<p>DILLTQSPVILSVSPGERVSFSC SASSGVITYMY WYQQRNGSPRLLIK LTNLAS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQWSSNPLT FGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL LSSPVTKSFNRGEC</p>	Cadena ligera anti-FMC63 humanizada ilustrativa
140	<p>QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLT DYYMK WVRQSPGKGLEWLG DINPNNGGTDYNQNFKG RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCAR EGNNYGSRDAMDY WGQGLTLTVSA</p> <p>TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Cadena pesada anti-FMC63 humanizada ilustrativa
141	<p>DILLTQSPVILSVSPGERVSFSC SASSGVITYMY WYQQRNGSPRLLIK LTNLAS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQWSSNPLT FGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC</p>	Cadena ligera anti-FMC63 humanizada ilustrativa
142	<p>QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSL TDYYMK WVRQSPGKGLE WIGDINPNNGGTD YNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYC AREGNNYGSRDAMD YWGQGLTLTVSA</p> <p>TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Cadena pesada anti-FMC63 humanizada ilustrativa
143	<p>DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSI IYMYWY QQRNGSPR PWYILTSNLA SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQWSSNPL TFGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC</p>	Cadena ligera anti-FMC63 humanizada ilustrativa

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
144	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVS GYSFTRY GVHWVRQSPGKGLEWLGVI HPSDSE TDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCAR IYYEEA WGQGTLVTSA TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadena pesada anti-FMC63 humanizada ilustrativa
145	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSC RASGNIHNYLA WYQQRINGSPRLLIK NAKTLAD GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QHFWSTPYT FGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	Cadena ligera anti-FMC63 humanizada ilustrativa
146	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT RYWMN WVRQSPGKGLEWLG MIHPSDSETRLNQKFKD RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCAR IYYEEA WGQGTLVTSA TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadena pesada anti-FMC63 humanizada ilustrativa
147	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSC RASGNIHNYLA WYQQRINGSPRLLIK NAKTLAD GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QHFWSTPYT FGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	Cadena ligera anti-FMC63 humanizada ilustrativa
148	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSL TRYWMN WVRQSPGKGLE WIGMIHPSDSETR YNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYC ASIYYEE YWGQGTLVTSA TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadena pesada anti-FMC63 humanizada ilustrativa
149	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSI HNYLAWY QQRINGSPR LLVYNAKTLA SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QHFWSTPY TFGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	Cadena ligera anti-FMC63 humanizada ilustrativa

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
150	ESKYGPPCPPCP	espaciador (bisagra de IgG4) (aa) de <i>Homo sapiens</i>
151	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	espaciador (bisagra de IgG4) (nt) de <i>Homo sapiens</i>
152	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	Espaciador bisagra-CH3 de <i>Homo sapiens</i>
153	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	Espaciador bisagra-CH2-CH3 de <i>Homo sapiens</i>
154	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-bisagra-Fc de <i>Homo sapiens</i>
155	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNKNTSISGDLHILPVAFRGDSFHTHTPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVHISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPEFVENSECICHPCELPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLFM	tEGFR artificial
156	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNKNTSISGDLHILPVAFRGDSFHTHTPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVHISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPEFVENSECICHPCELPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLFM	tEGFR artificial
157	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 153-179 de N.º de registro P10747)
158	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 114-179 de N.º de registro P10747)
159	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747) de <i>Homo sapiens</i>
160	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (de LL a GG) de <i>Homo sapiens</i>
161	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1) de <i>Homo sapiens</i>
162	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>
163	RVKFSRSAEPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>

ES 3 004 039 T3

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
164	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:

una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 89 o 90, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 91, 92 o 93 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94; y

una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97, en donde:

(i) el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se unen específicamente a un anticuerpo diana o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden la secuencia de la región variable de cadena pesada (VH) establecida en la SEQ ID NO: 30 y la secuencia de la región variable de cadena ligera (VL) establecida en la SEQ ID NO: 31; y

(ii) el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo agonista de un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno.

2. El anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno comprenden:

una región variable de cadena ligera (VL) que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región VL establecida en la SEQ ID NO: 40; y

una región variable de cadena pesada (VH) que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región VH establecida en la SEQ ID NO: 36.

3. El anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:

la región VH del anticuerpo o del fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y

la región VL del anticuerpo o del fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40.

4. El anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que está humanizado.

5. El anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un fragmento de unión a antígeno, opcionalmente en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona entre fragmentos de unión a antígeno del fragmento (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv o un fragmento variable de cadena única (scFv).

6. El anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que son un anticuerpo de longitud completa.

7. El anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo o el fragmento se unen específicamente a un fragmento variable de cadena única (scFv) comprendido en la porción extracelular de un receptor de antígeno quimérico, en donde el scFv comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 30 y una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 31; y/o comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 34.

8. Un conjugado, que comprende el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y una molécula o una fracción heteróloga, opcionalmente, en donde la molécula o fracción heteróloga es:

i) un marcador, opcionalmente en donde el marcador se selecciona entre un colorante fluorescente, una proteína fluorescente, un radioisótopo, un cromóforo, un ion metálico, una partícula de oro, una partícula de plata, una partícula magnética, un polipéptido, una enzima, una estreptavidina, una biotina, un compuesto luminiscente o un oligonucleótido; o

ii) una proteína, un péptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña, que opcionalmente son o comprenden una toxina o un Strep-Tag.

9. Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo antiidiotipo o del fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

10. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.

11. Una célula, que comprende el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de una

cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.

12. Un método de producción de un anticuerpo antiidiotipo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende expresar las cadenas pesada y ligera codificadas por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9 o el vector de la reivindicación 10 en una célula hospedadora adecuada y recuperar o aislar el anticuerpo.

13. Una composición que comprende el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, el conjugado de la reivindicación 8 o la célula de la reivindicación 11, que comprende opcionalmente además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. Un método para detectar un anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) poner en contacto una composición que comprende un anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo con el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o el conjugado de la reivindicación 8 que se une específicamente al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden la secuencia de la región variable de cadena pesada (VH) establecida en la SEQ ID NO: 30 y la secuencia de la región variable de cadena ligera (VL) establecida en la SEQ ID NO: 31; y
- (b) detectar el anticuerpo antiidiotipo unido al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno,

opcionalmente en donde el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno se expresa en la superficie de una célula, en donde la célula expresa en su superficie un CAR que comprende el anticuerpo diana o el fragmento de unión a antígeno y la detección en (b) comprende detectar células unidas con el anticuerpo antiidiotipo.

15. Un método *in vitro* o *ex vivo* para la estimulación de células, que comprende incubar una composición de entrada que comprende células que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo diana o un fragmento de unión a antígeno del mismo con el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o el conjugado de la reivindicación 8 que se une específicamente al anticuerpo diana o al fragmento de unión a antígeno del mismo, generando de esta manera una composición de salida que comprende células estimuladas, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden la secuencia de la región variable de cadena pesada (VH) establecida en la SEQ ID NO: 30 y la secuencia de la región variable de cadena ligera (VL) establecida en la SEQ ID NO: 31.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo están inmovilizados en un soporte sólido, que opcionalmente comprende o está conjugado con un reactivo que comprende una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse reversiblemente al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo,

- opcionalmente en donde el reactivo comprende una muteína de estreptavidina; o
- en donde el anticuerpo antiidiotipo o el fragmento de unión a antígeno del mismo están inmovilizados en un reactivo soluble, que opcionalmente es o contiene una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse reversiblemente al anticuerpo antiidiotipo o al fragmento de unión a antígeno del mismo,
- opcionalmente en donde el reactivo comprende una muteína de estreptavidina.

17. El método de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde la incubación dura al menos 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36, 48 horas, 72 horas o 96 horas, y/o en donde la composición de entrada comprende menos del 60 %, menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 20 % o menos del 10 % de células que expresan CAR como porcentaje del total de células en la composición.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en donde:

- el número de células que expresan CAR en la composición de salida aumenta en más de 1,2 veces, 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 10 veces o más en comparación con el número de células que expresan CAR en la composición de entrada; y/o
- el porcentaje de expresión de CAR en la composición de salida en comparación con el total de células en la composición aumenta en más del 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más; y/o
- antes de la introducción y/o incubación, las células no se seleccionan ni se enriquecen con células que expresan CAR.

FIG. 1

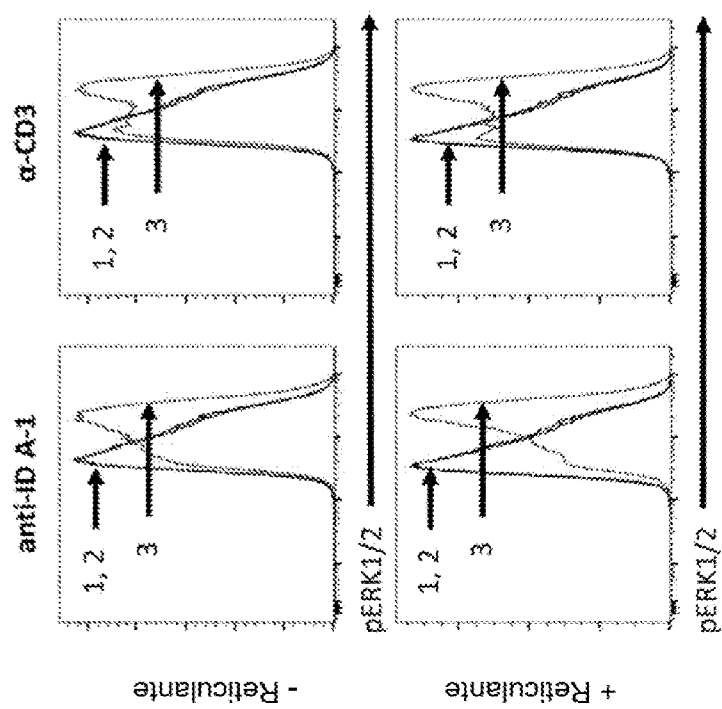


FIG. 2A

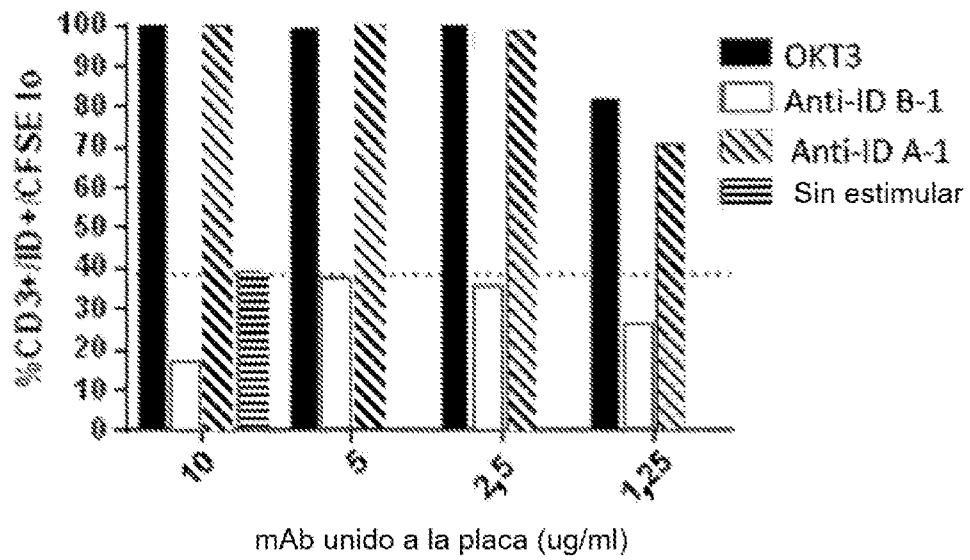
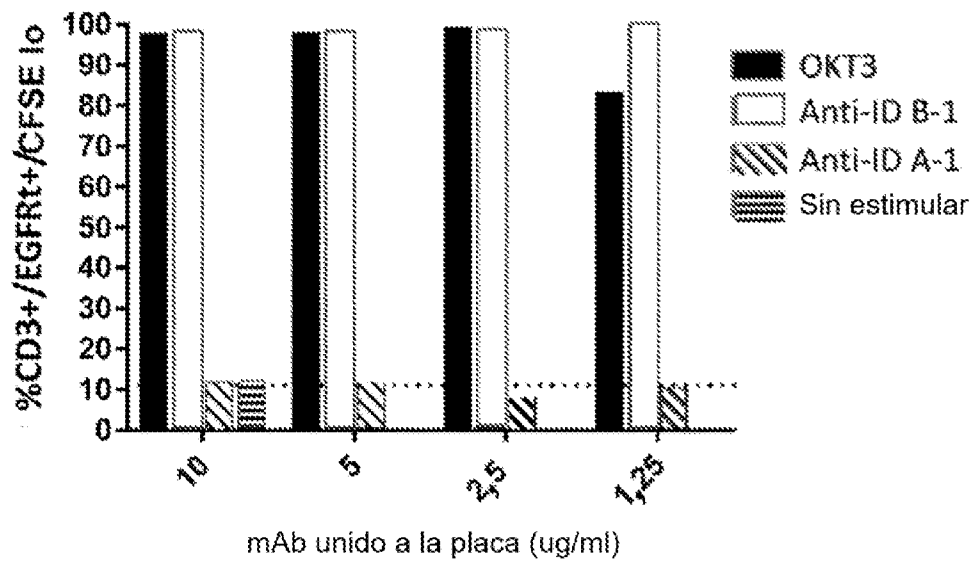
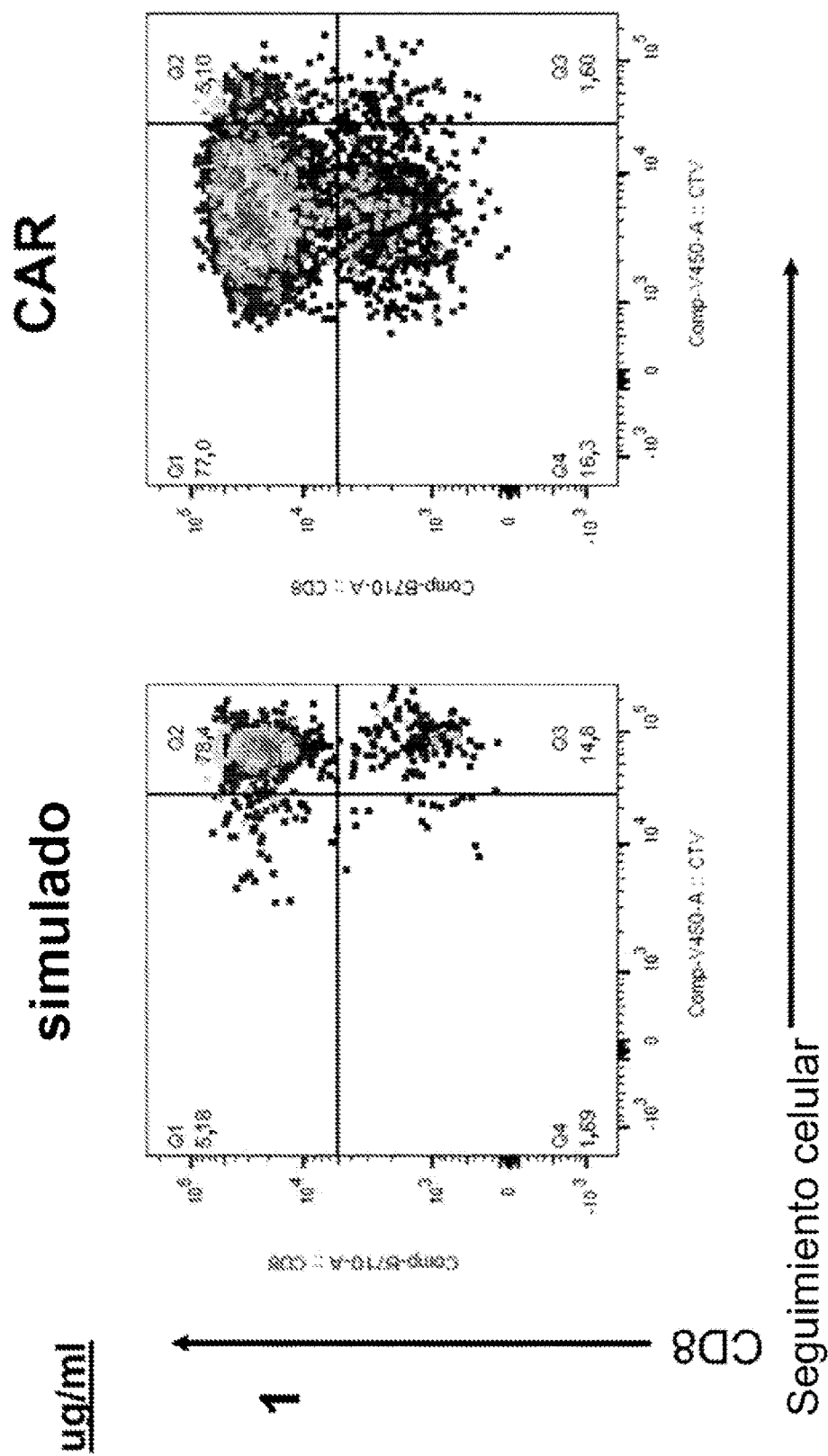


FIG. 2B





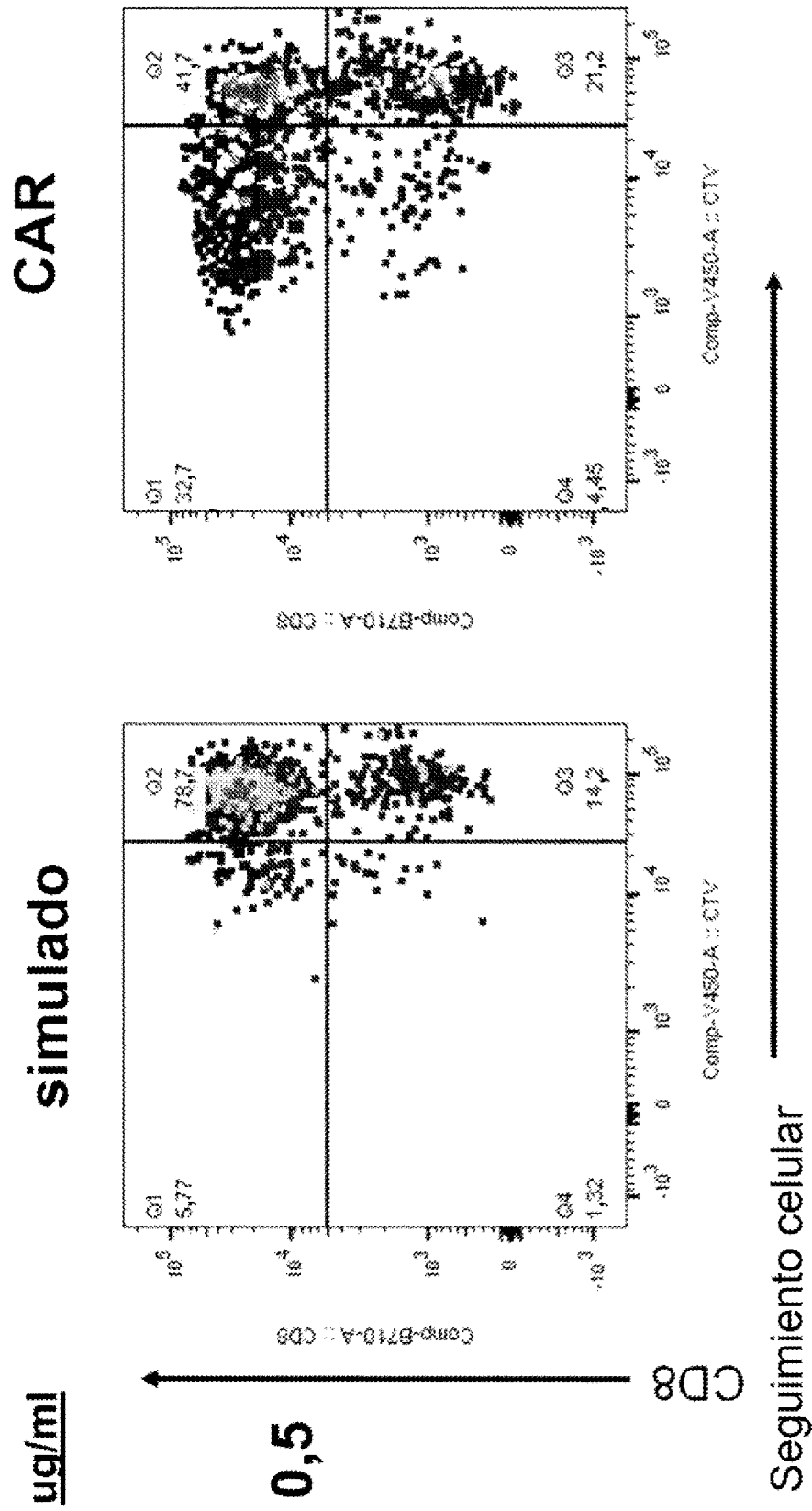


FIG. 2C Cont.

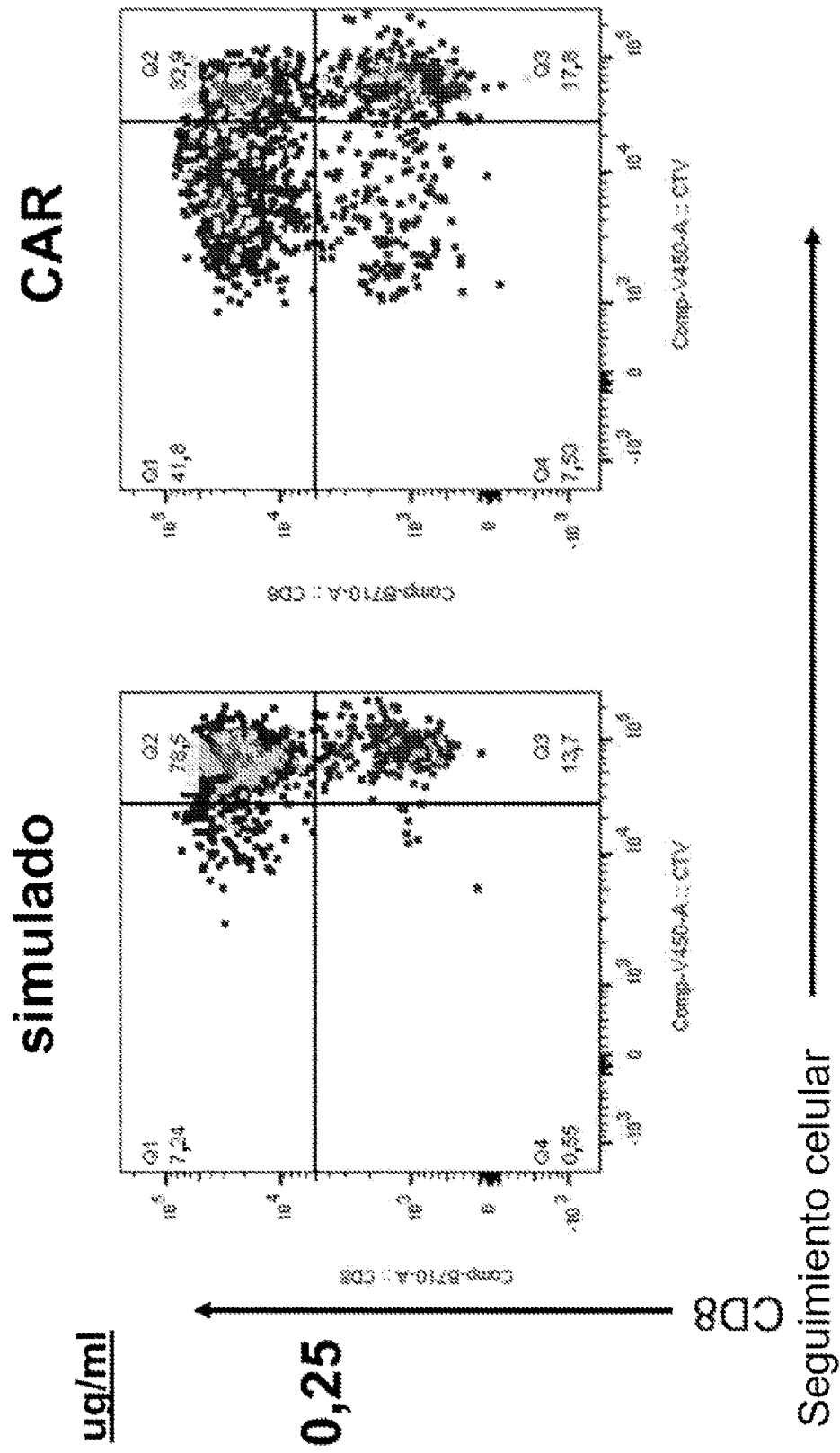
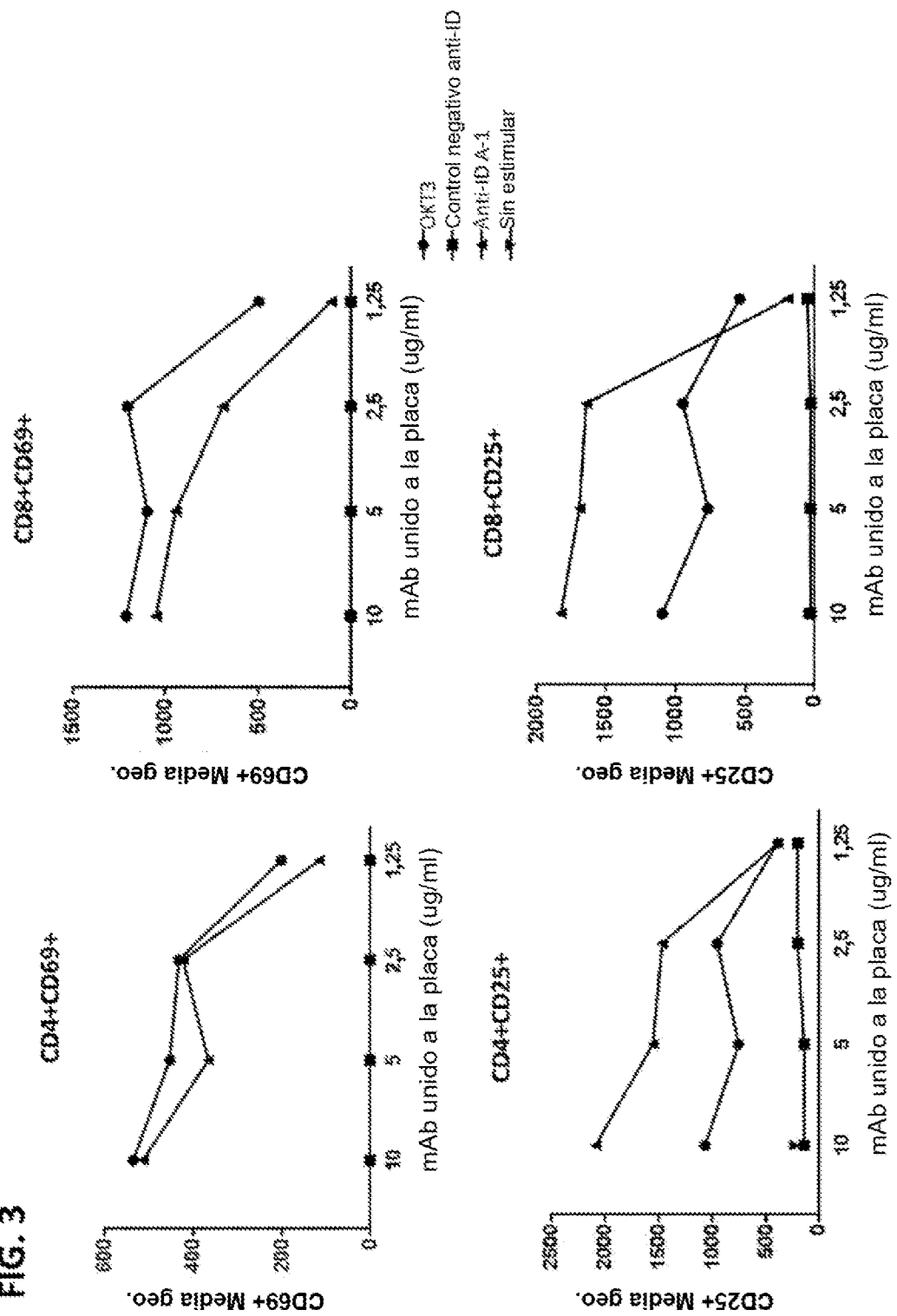


FIG. 2C Cont.

FIG. 3



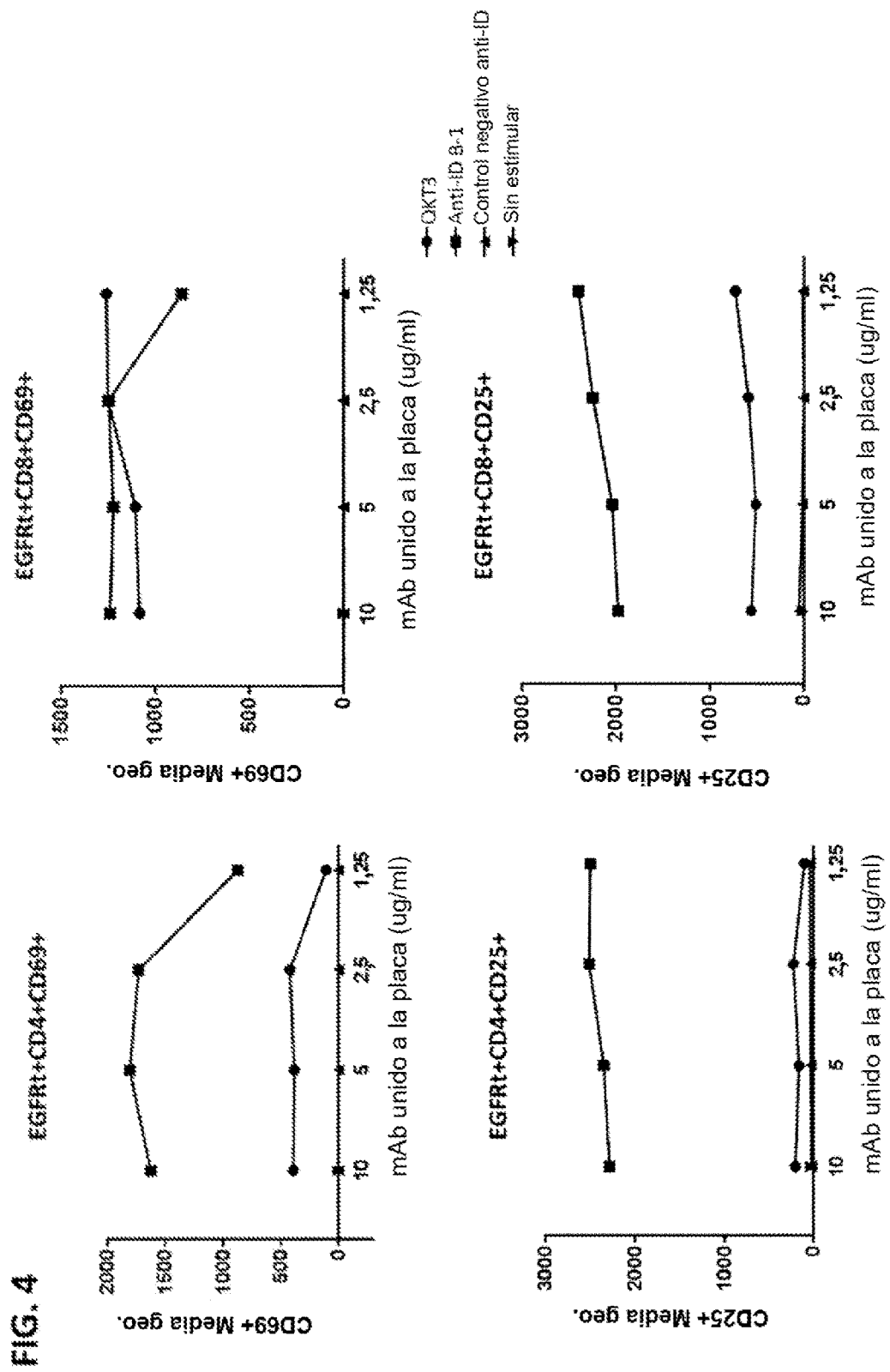


FIG. 5

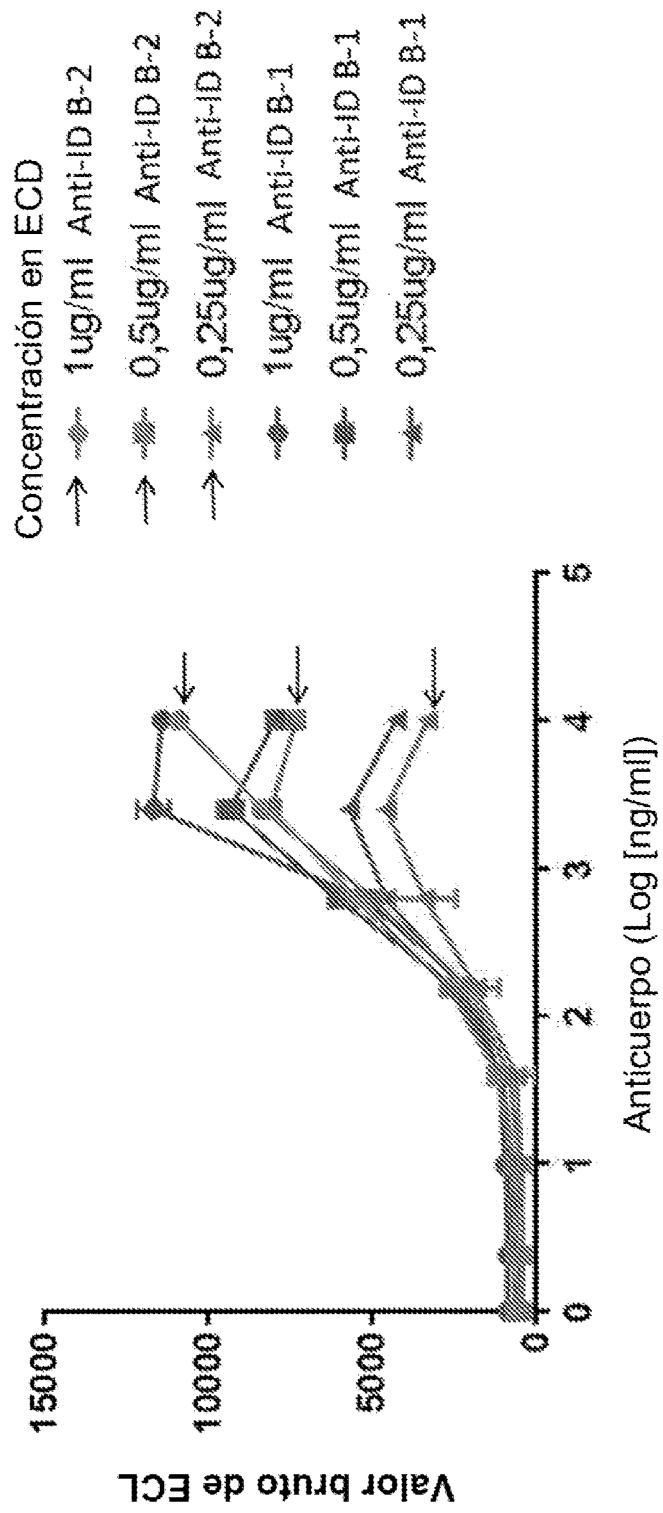


FIG. 6

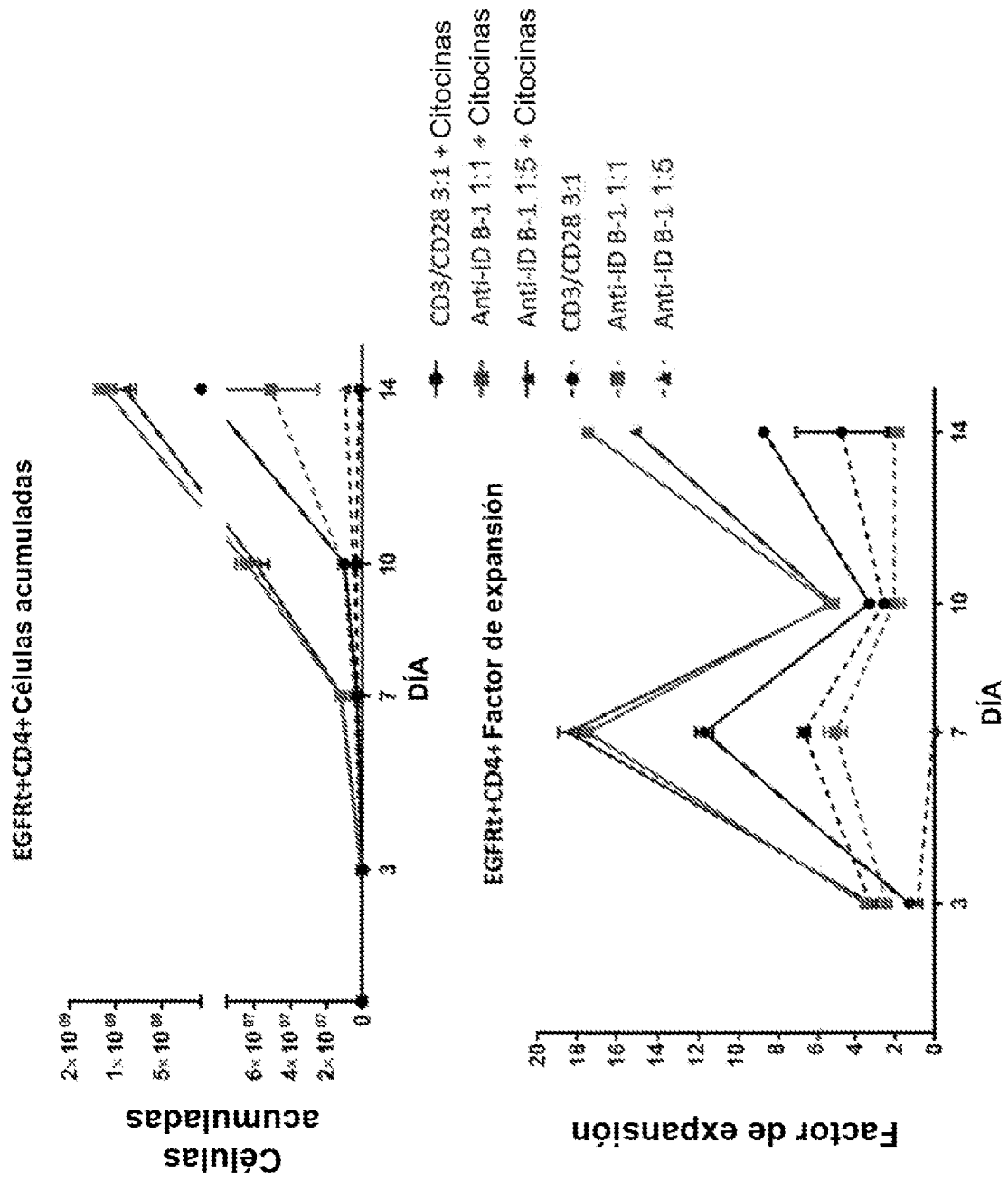
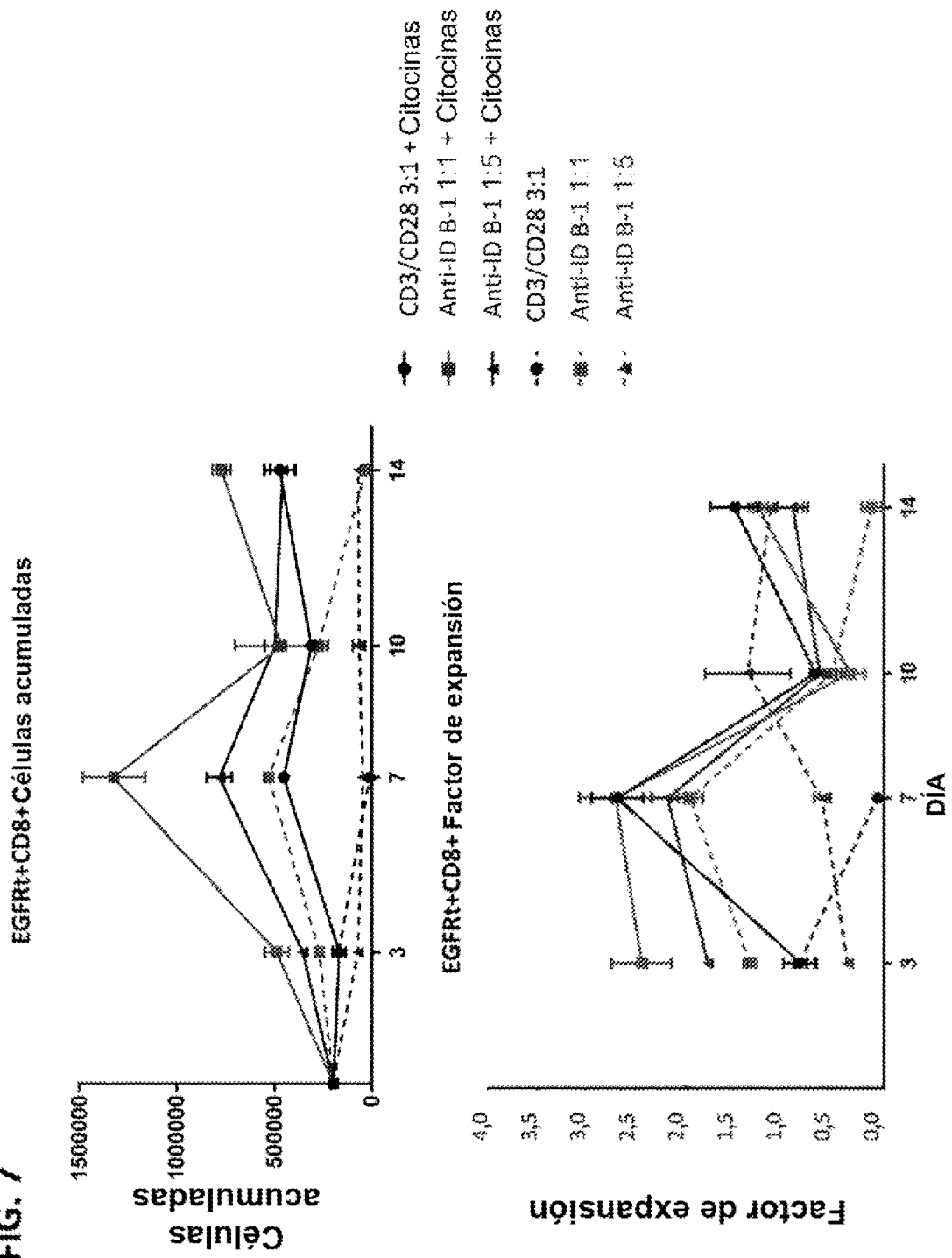
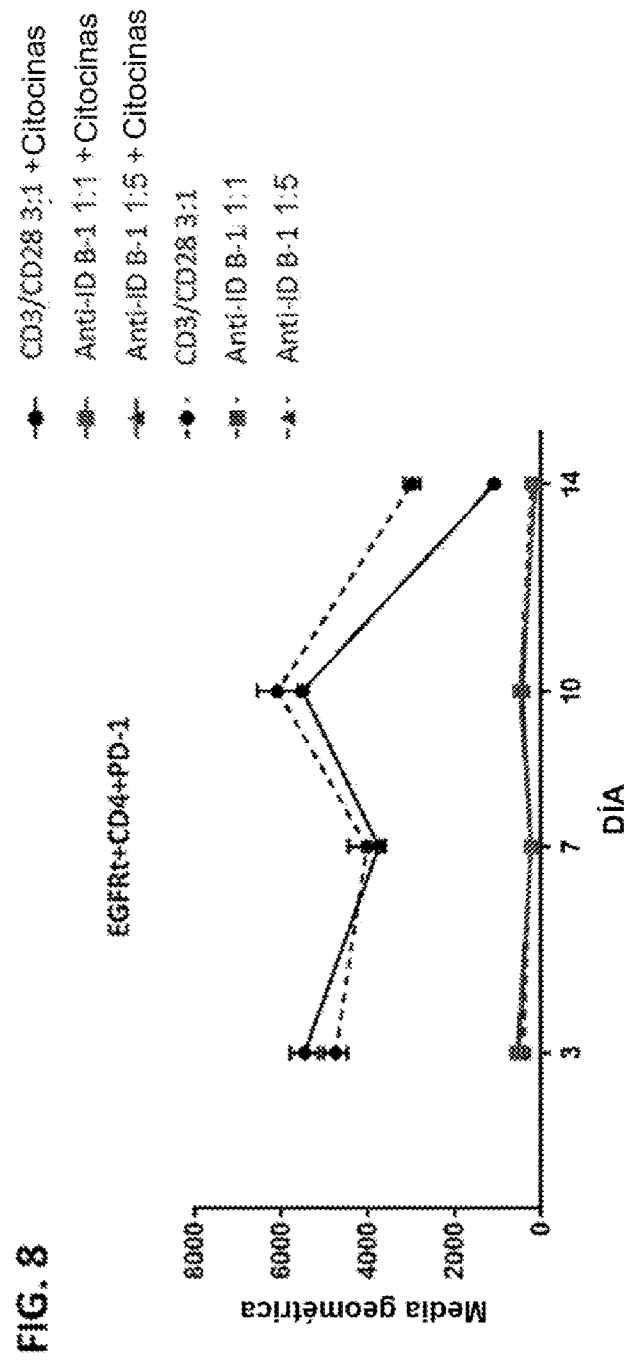
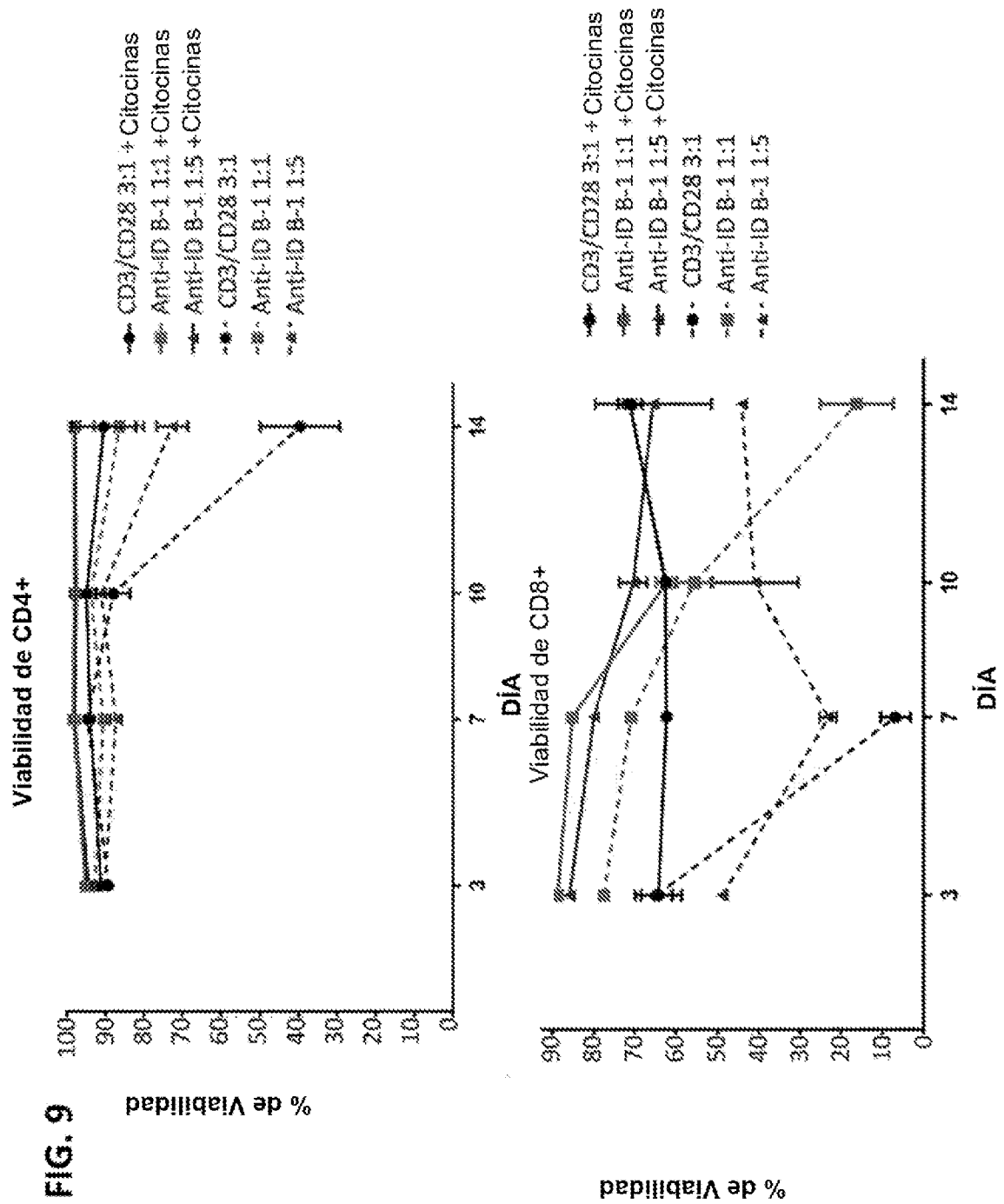


FIG. 7







IL-2

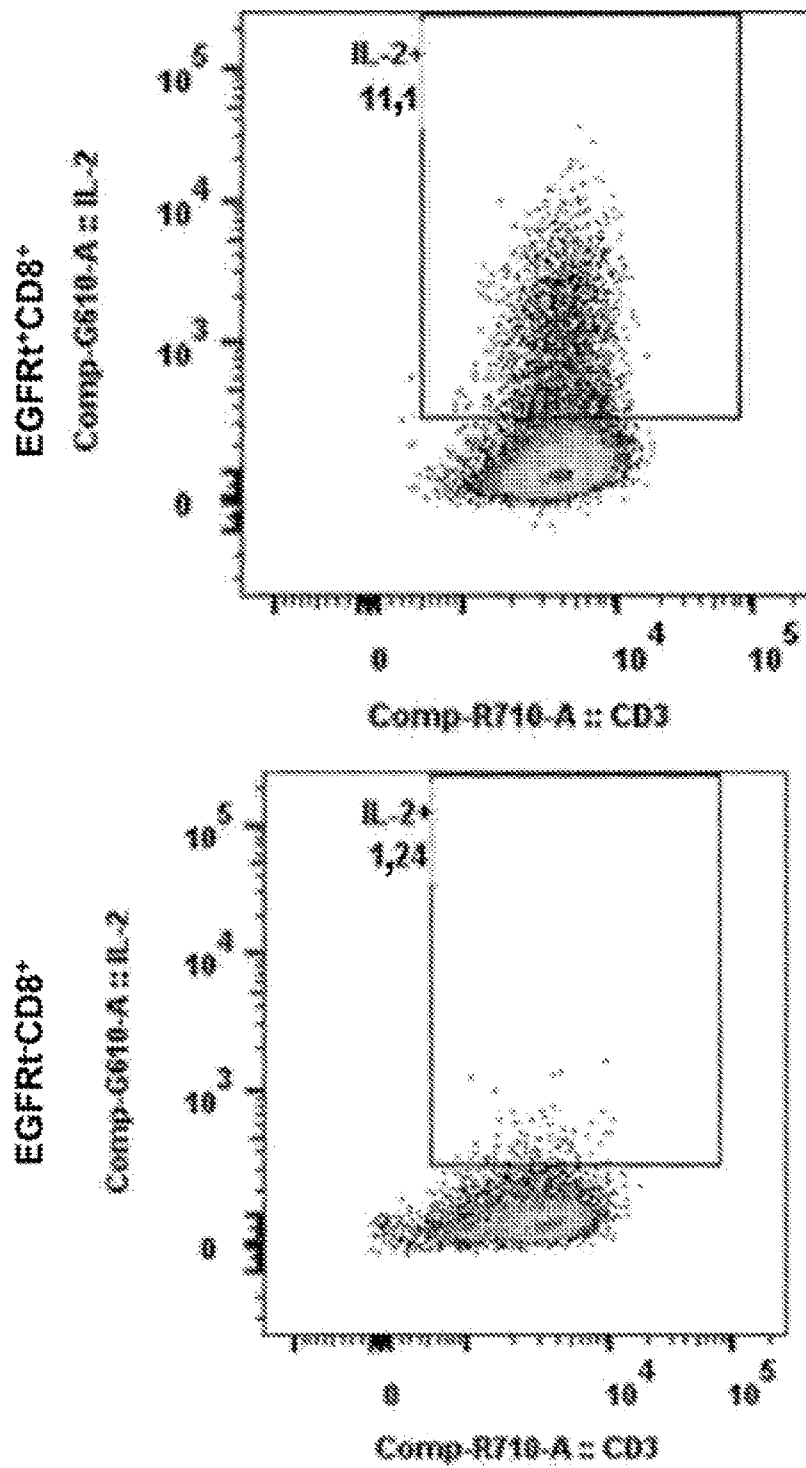


FIG. 10A

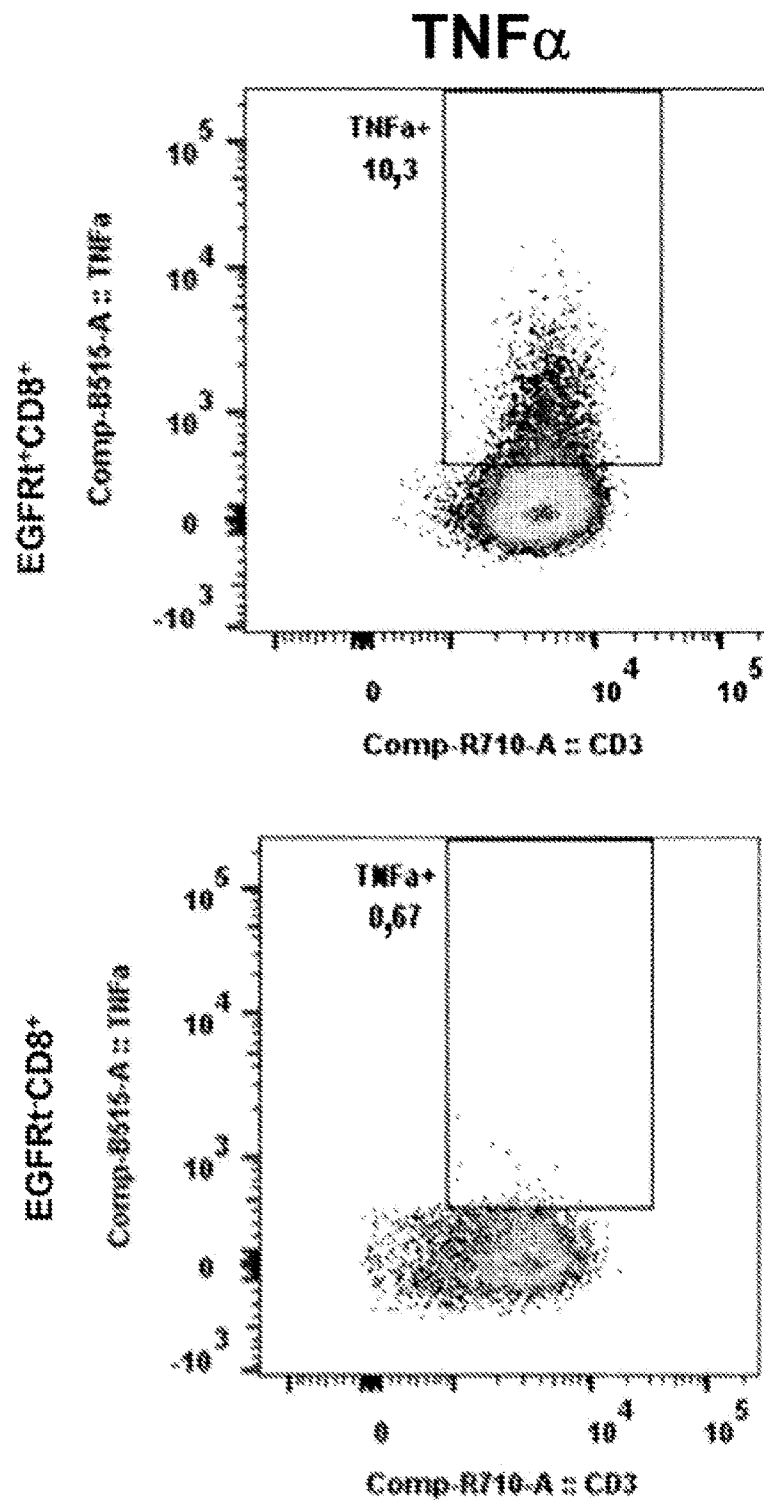


FIG. 10A Cont.

IFN γ

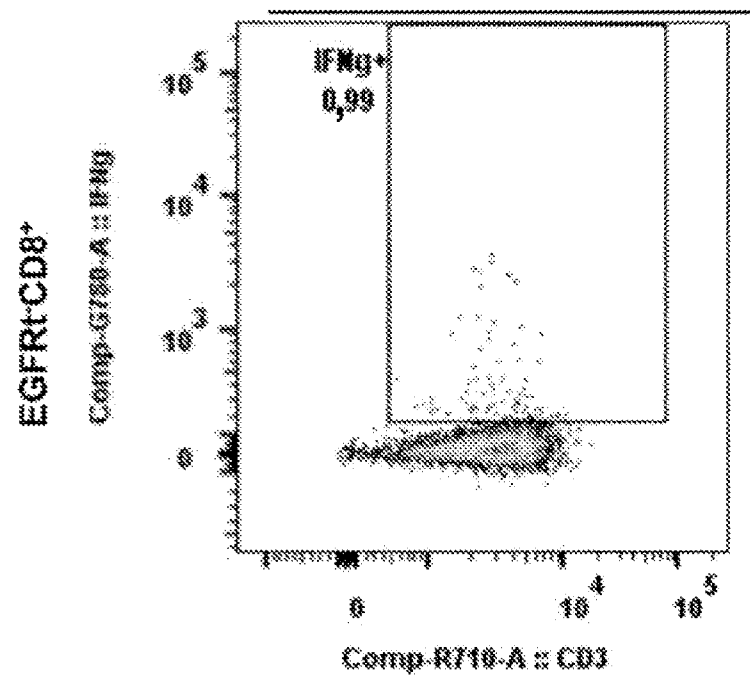
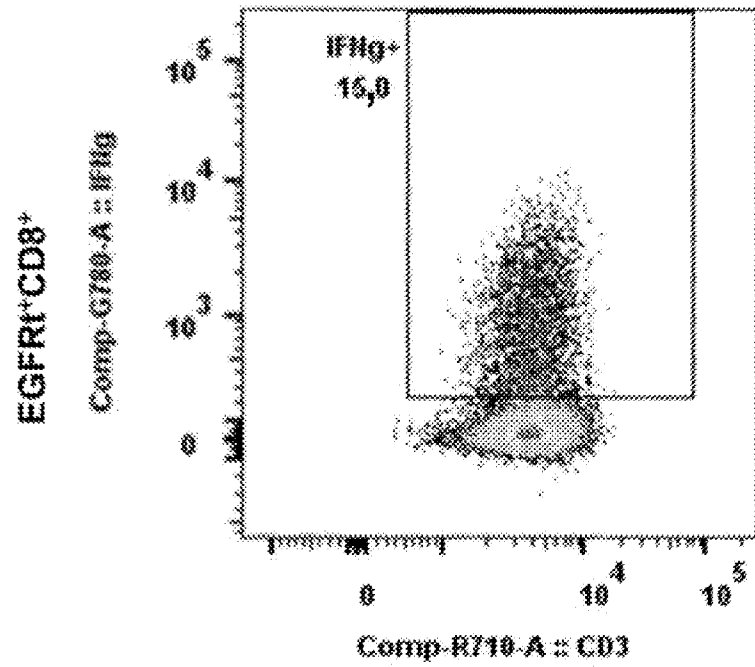
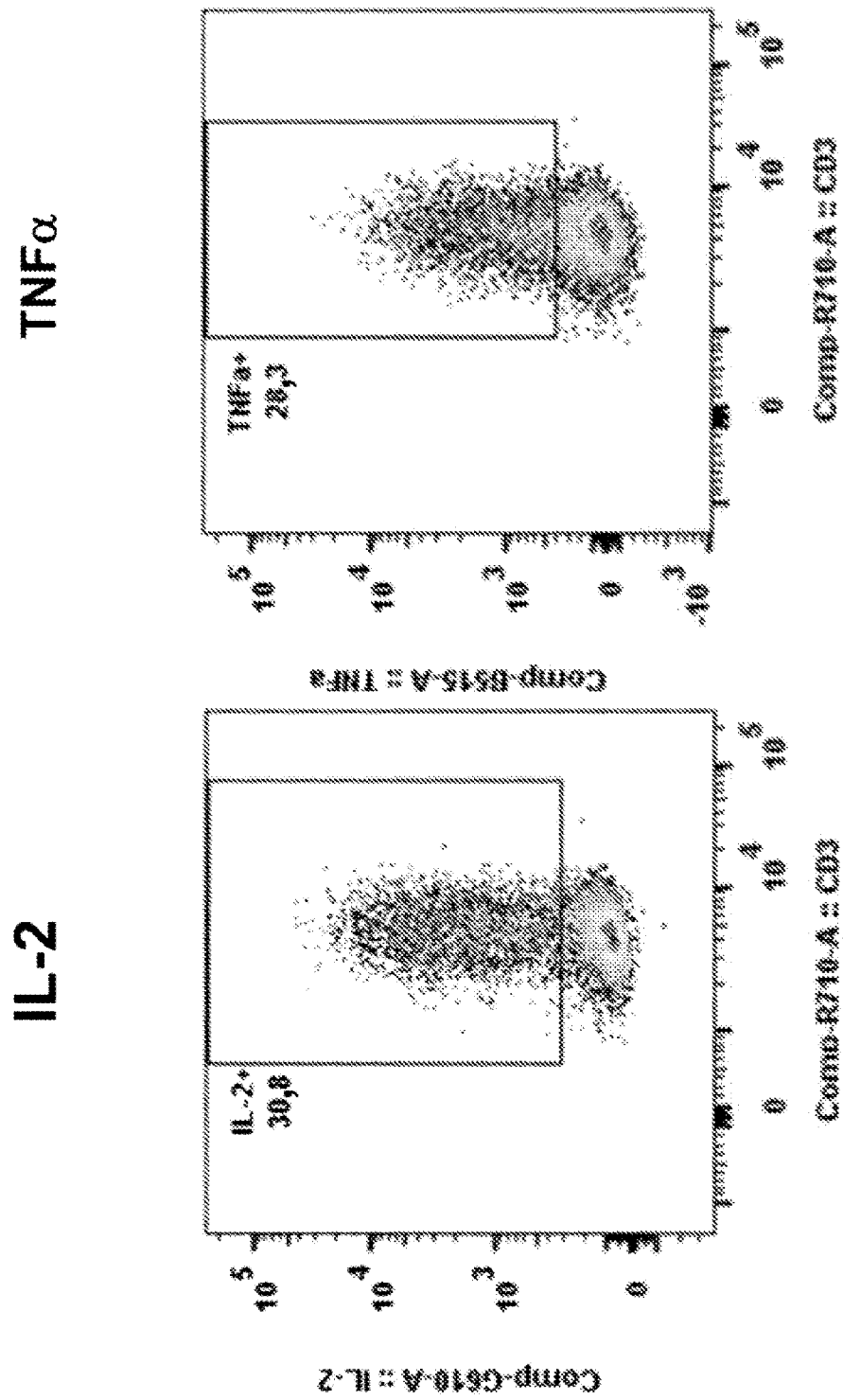


FIG. 10A Cont.



K562-CD19 (E:T = 1:2)

FIG. 10B

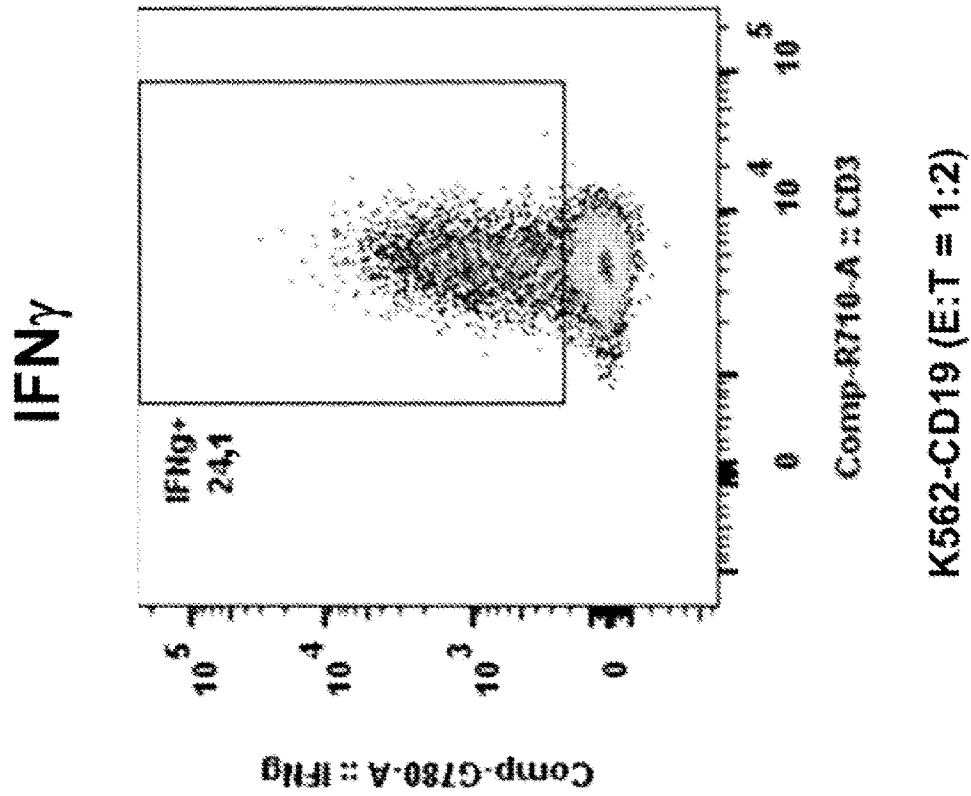


FIG. 10B Cont.

FIG. 11

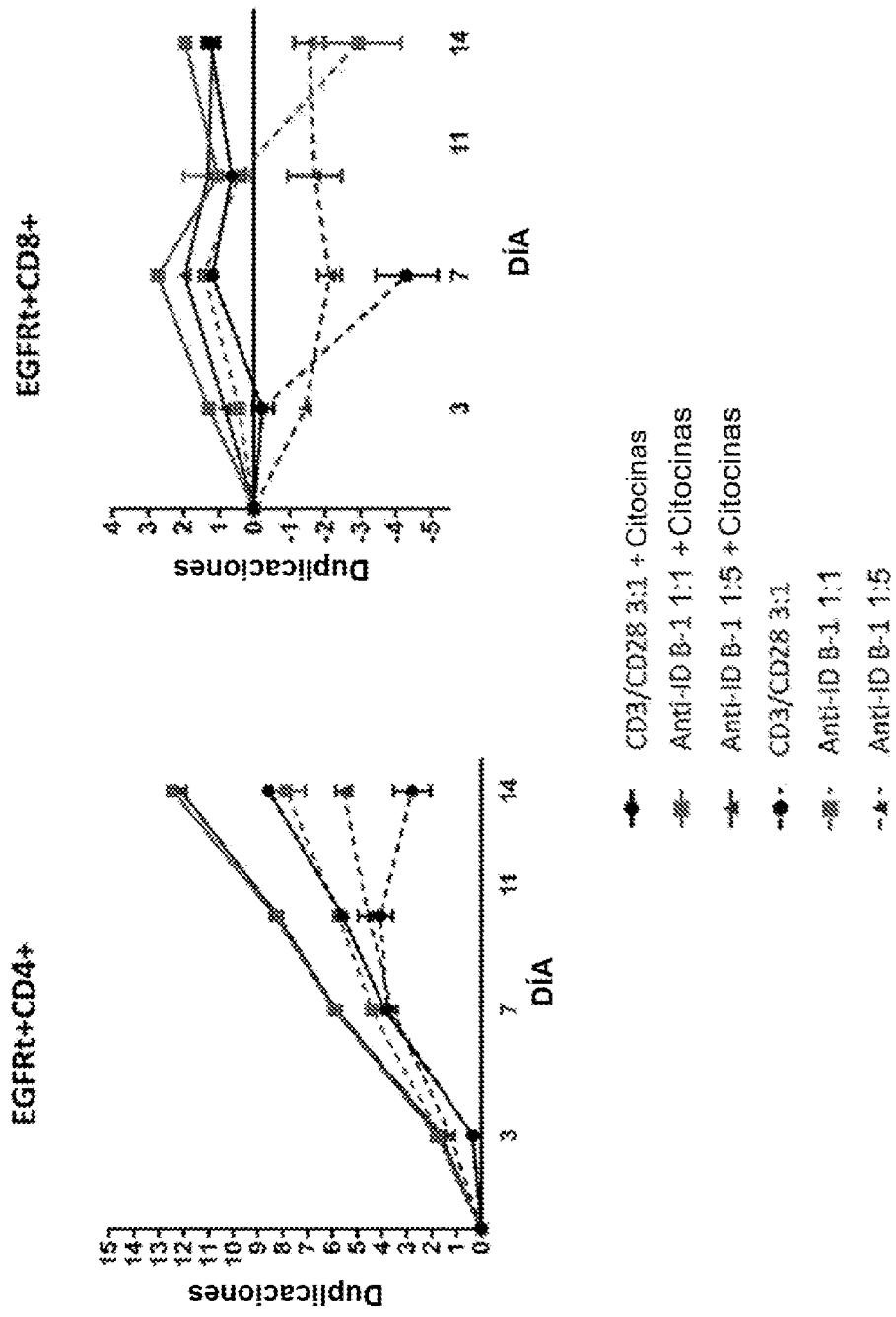


FIG. 12A

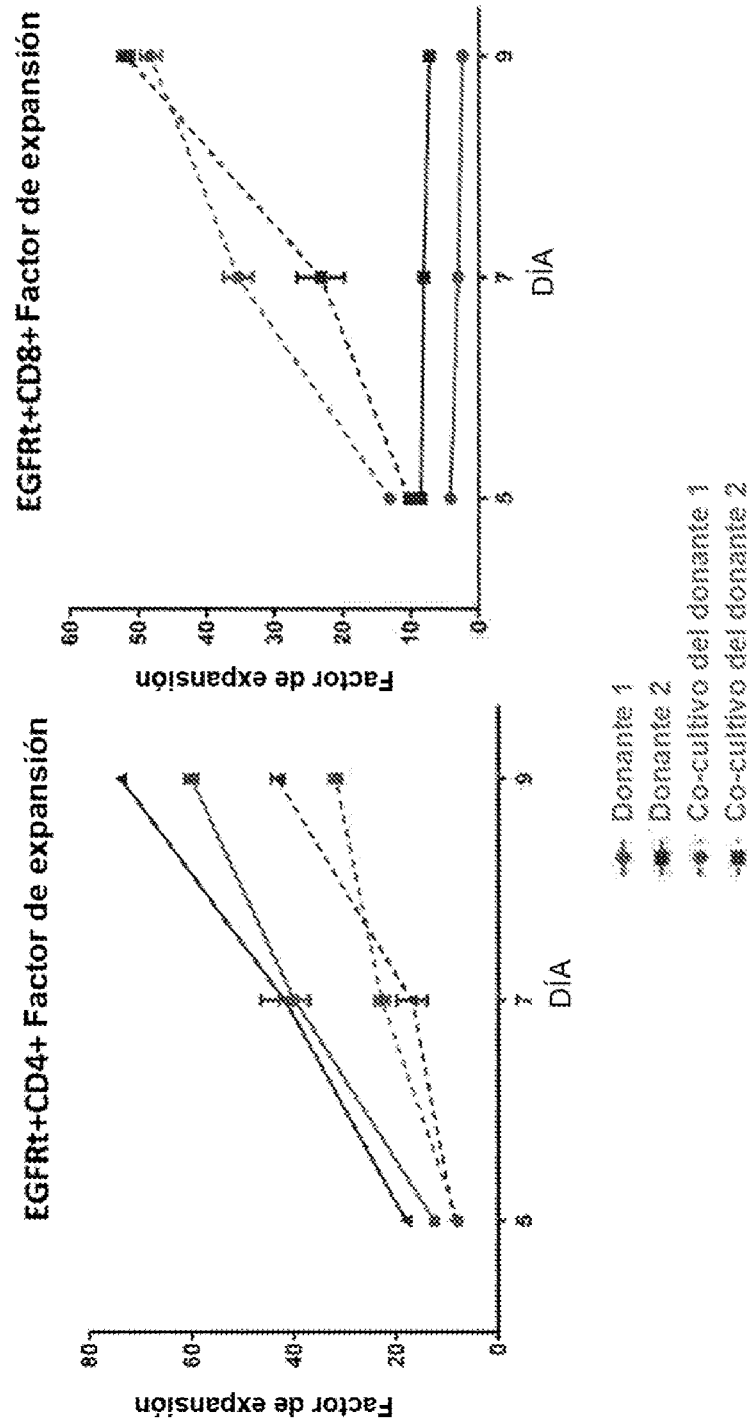


FIG. 12B

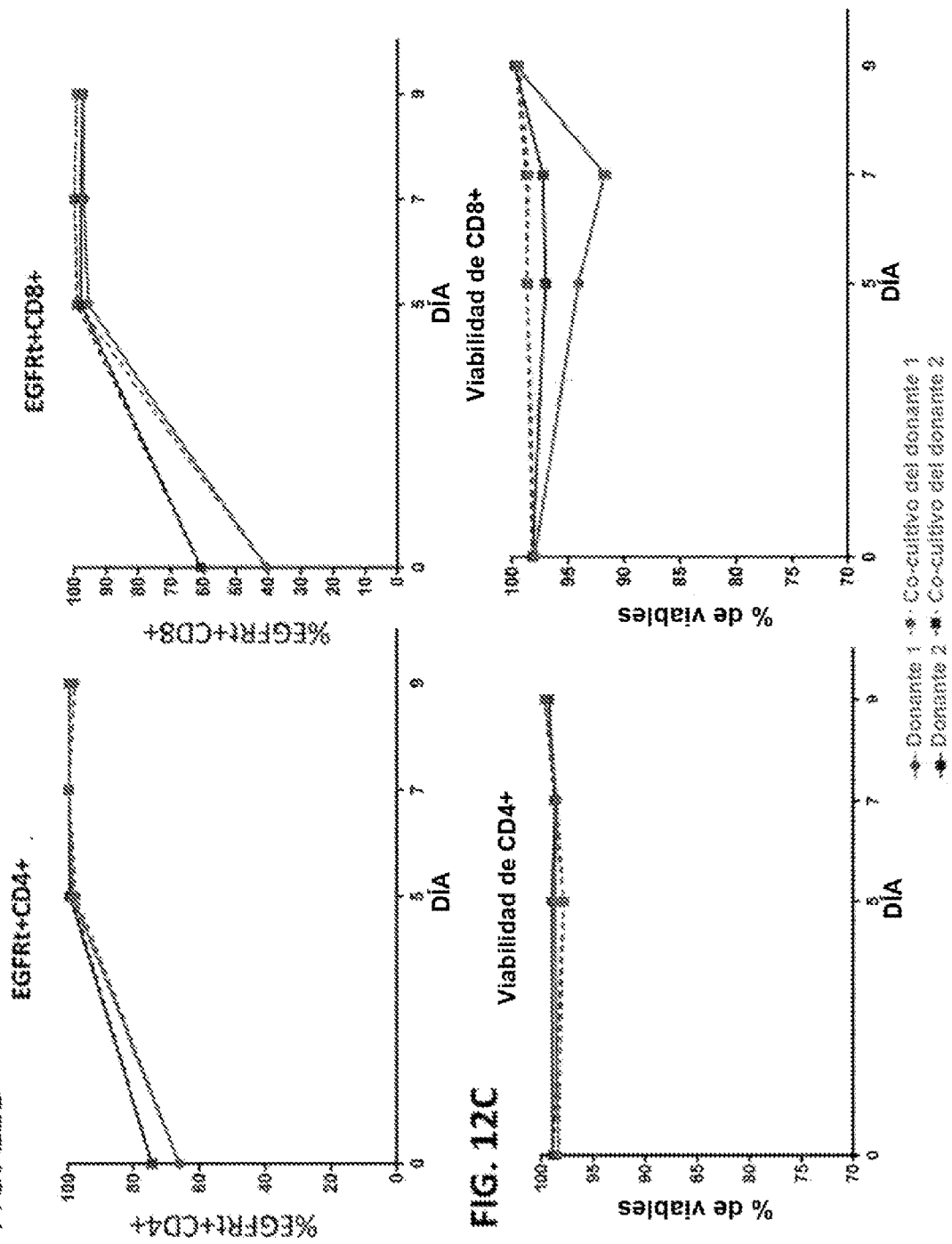


FIG. 12C

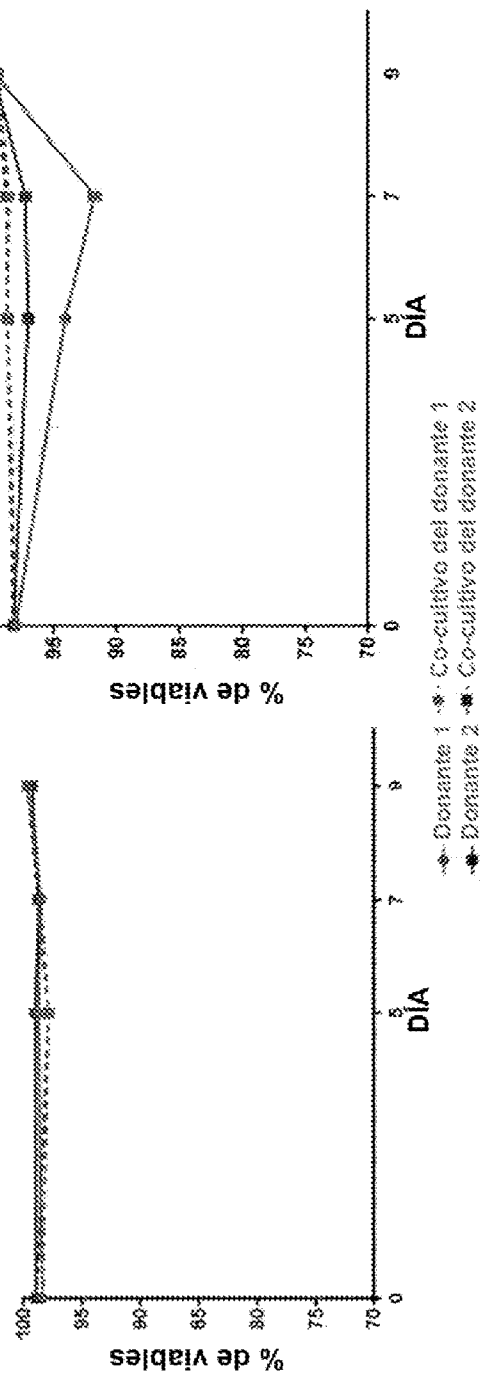


FIG. 13A

EGFRt+CD4+PD-1



EGFRt+CD8+PD-1

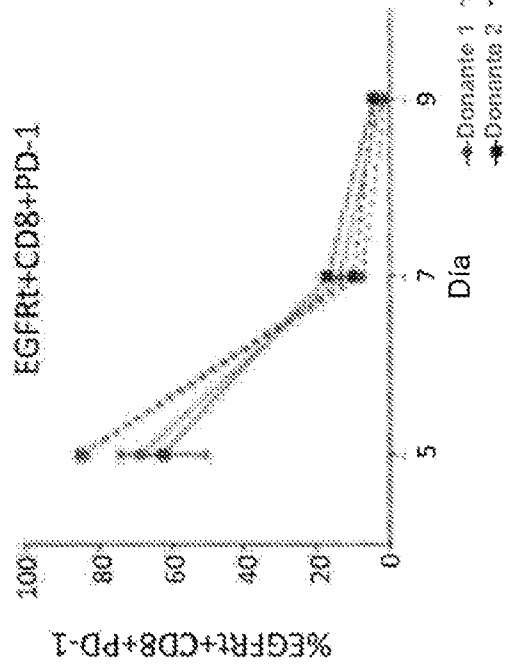
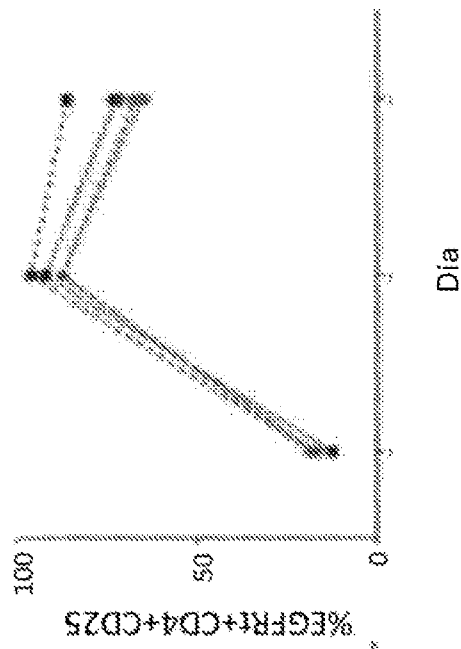
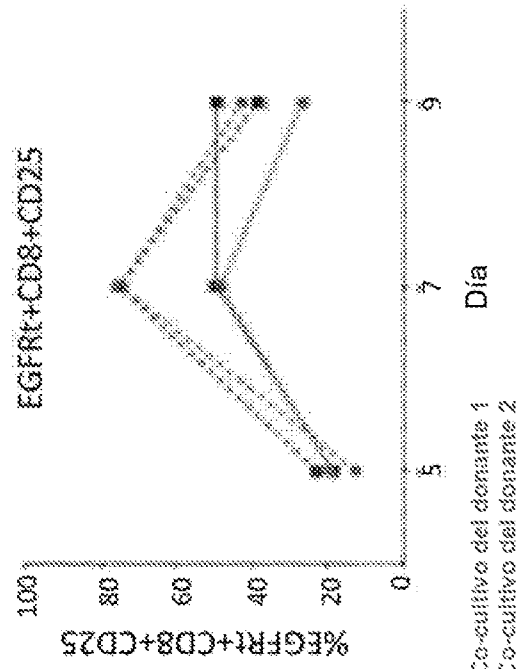


FIG. 13B

EGFRt+CD4+CD25

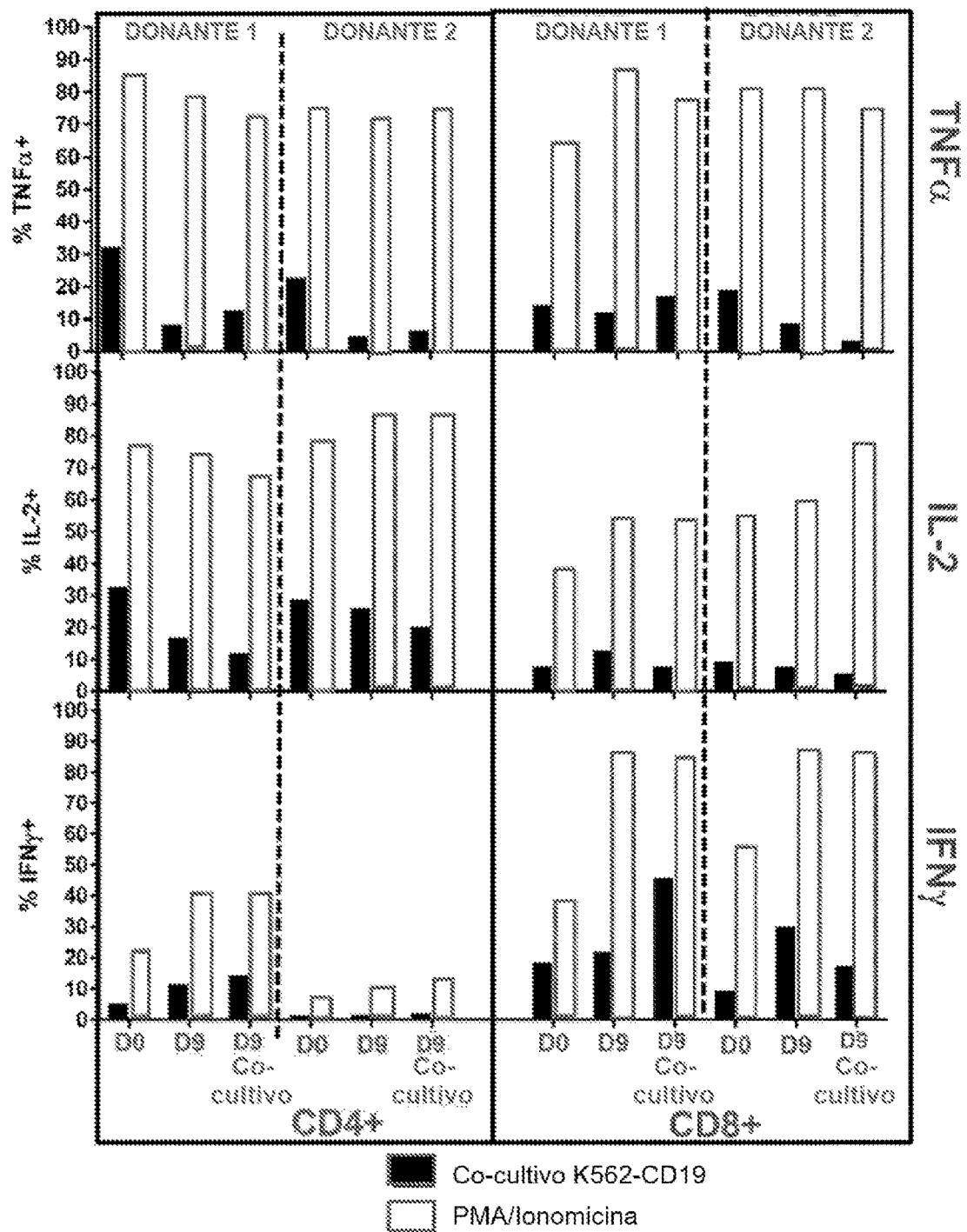


EGFRt+CD8+CD25



◆ Donante 1
◆ Co-cultivo del donante 1
◆ Donante 2
◆ Co-cultivo del donante 2

FIG. 14A



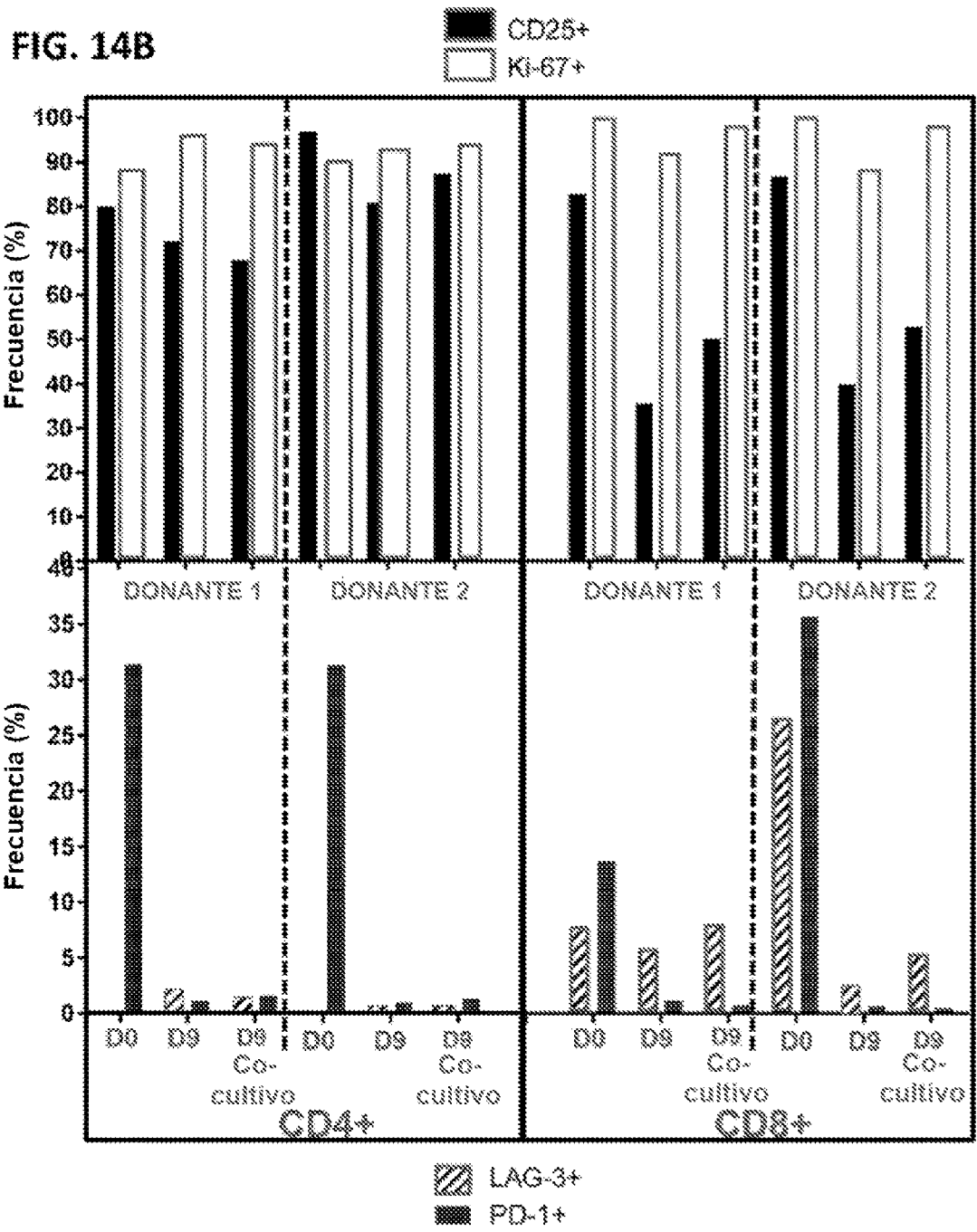


FIG. 15A

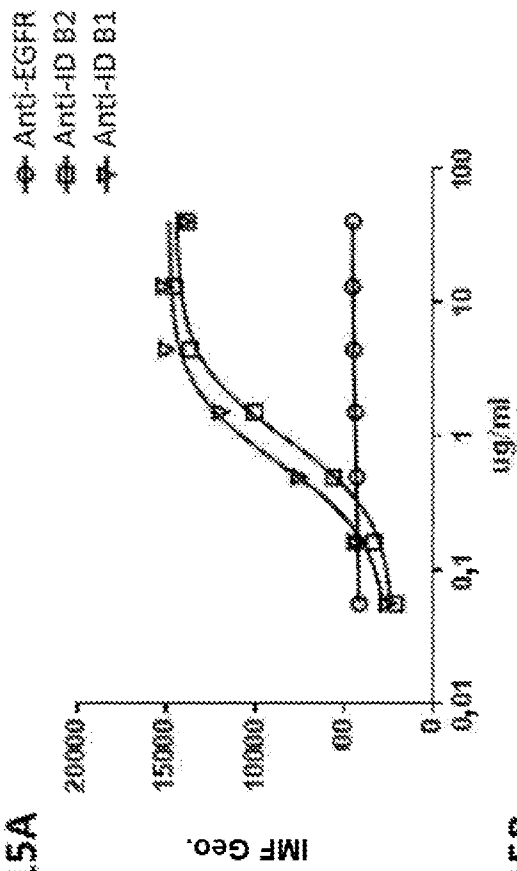


FIG. 15B

