

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 098**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2012 PCT/US2012/021339**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12097313**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012 E 12734733 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2663579**

54 Título: **Anticuerpos terapéuticos contra la proteína ROR-1 y procedimientos para el uso de los mismos.**

30 Prioridad:

**14.01.2011 US 201161433043 P**

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

**26.09.2017**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street 12th Floor  
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**KIPPS, THOMAS, J.;  
WIDHOPF II, GEORGE, F. y  
CUI, BING**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 634 098 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 terapéuticos contra la proteína ROR-1 y procedimientos para el uso de los mismos

## 5 ANTECEDENTES

Las tirosina cinasas son mediadores importantes de la cascada de señalización, determinando papeles clave en diversos procesos biológicos como crecimiento, diferenciación, metabolismo y apoptosis en respuesta a estímulos externos e internos. Estudios han implicado el papel de las tirosina cinasas en la fisiopatología del  
 10 cáncer. Schlessinger J. (2000) *Cell*, 103:211-225; y Robinson *et al.* (2000) *Oncogene*, 19: 5548-5557. MacKeigan y colaboradores usaron un enfoque de iARN a gran escala para identificar cinasas que podrían regular la supervivencia y apoptosis de una línea celular tumoral humana (HeLa), la iARN de ROR1 se encontró como una de las más potentes en la inducción de apoptosis entre el conjunto de iARN orientadas a cada uno de 73 genes codificantes de cinasa diferentes. MacKeigan *et al.* (2005) *Nat Cell Biol.*, 7: 591-600. Sin embargo, estos  
 15 investigadores no examinaron la expresión o función de la proteína ROR1 en estas células.

La ROR1, receptor huérfano similar a receptor de tirosina cinasa, es una molécula expresada a altos niveles durante la embriogénesis que desempeña un papel principal en el desarrollo de esqueleto, pulmones y sistema nervioso. La expresión de ROR1 disminuye en gran medida en células de mamífero postparto a niveles que son apenas  
 20 detectables. La ROR1 es un receptor de membrana con un dominio similar a cinasa intracelular y un dominio rico en cisteína similar a Frizzled extracelular que es común en receptores de miembros de la familia Wnt. La ROR1 es un miembro de la familia ROR que está evolutivamente conservado entre *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, ratones y seres humanos. Wilson C, Goberdhan DC, Steller H. Dror, a potential neurotrophic receptor gene, encodes a *Drosophila* homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*.  
 25 1993;90:7109-7113; Oishi *et al.* (1997) *J Biol Chem.*, 272:11916-11923; Masiakowski *et al.* (1992) *J Biol Chem.*, 267:26181-26190; Forrester *et al.* (2002) *Cell Mol Life Sci.*, 59:83-96; and Oishi *et al.* (1999) *Genes Cells*, 4:41-56. El papel funcional real de la proteína ROR1 durante la embriogénesis es desconocido, aunque se cree que es un receptor para proteínas Wnt que regulan la polaridad celular y las interacciones de célula con célula.

Aunque es principalmente una proteína embrionaria, la ROR1 se expresa excepcionalmente en ciertas células cancerosas, incluyendo en LLC, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de linfocitos B de células marginales, linfoma de Burkett y otros cánceres (p.ej., cánceres de mama), pero no en tejidos y células adultos normales. En un estudio reciente, se encontró que la ROR1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, se expresaba en gran medida en linfocitos B de LLC pero no en linfocitos B normales. Además, se encontró que la ROR1 es un receptor de Wnt5a,  
 35 que podría inducir la activación de NF- $\kappa$ B cuando se coexpresa con ROR1 en células HEK293 y mejora la supervivencia de células de LLC *in vitro*. Esto indica que la ROR1 es un receptor de señalización de la supervivencia a LLC para Wnt5a. Otro estudio encontró que la ROR1 se expresaba también en leucemia linfocítica aguda (LLA). Shabani *et al.* (2007) *Tumour Biol.*, 28:318-326; and Baskar *et al.* (2008) *Clin Cancer Res.*, 14:396-404. La expresión de proteína ROR1 se ha demostrado ahora en una variedad de cánceres hematológicos y de tumores  
 40 sólidos.

El control terapéutico de la expresión de ROR1 es necesario. Sin embargo, aunque están comercialmente disponibles anticuerpos policlonales anti-ROR1 creados contra el péptido ROR1. Los inventores desarrollaron un anticuerpo monoclonal anti-ROR1, denominado 4A5, que reacciona con la proteína ROR1 nativa y es capaz de  
 45 detectar la expresión en superficie celular de ROR1 para análisis citométrico de flujo.

Este anticuerpo es divulgado por Fukuda, T. *et al.*, *PNAS et al.* (2008) 105(8):3047-3052.

Sin embargo, no han estado disponibles anticuerpos terapéuticos robustos con capacidad demostrable para inhibir la  
 50 proliferación de células cancerosas mediada por ROR1 a un grado que sea terapéuticamente significativo para retardar o prevenir el crecimiento y metástasis.

## RESUMEN DE LA INVENCION:

55 La invención proporciona anticuerpos y combinación de anticuerpos para la inhibición *in vivo* e *in vitro* de la proliferación mediada por células ROR1 de células de sujetos con cáncer, incluyendo linfomas, LLC, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de linfocitos B de células marginales, linfoma de Burkett, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma espinocelular epitelial, melanoma, mieloma, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario,  
 60 cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y

cuello, pero no en linfocitos sanguíneos o esplénicos de pacientes no leucémicos o adultos normales.

Los anticuerpos de la invención son también útiles para la diferenciación entre células cancerosas que expresan ROR1 ("cáncer de ROR1") y células normales. Por ejemplo, se proporciona un inmunoensayo que detecta ROR1 en una muestra de un sujeto mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo específico de ROR1 de la invención y la detección de la inmunorreactividad entre el anticuerpo y ROR1 en la muestra.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se diagnostica un cáncer de ROR1 en un sujeto detectando la presencia o cantidad de proteína ROR1 en una muestra.

La presente invención incluye composiciones que incluyen anticuerpos monoclonales aislados purificados y combinaciones de los mismos que se unen específicamente a la proteína receptora ROR1.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una serie de gráficas que ilustran los resultados del análisis citométrico de flujo de la expansión de linfocitos B de leucemia CD5+B220<sup>low</sup> en ratones Tg de ROR1 después de la transferencia adoptiva de  $1 \times 10^7$  esplenocitos de un ratón Tg de ROR1 x TCL1. El panel superior representa la expansión de 2 a 4 semanas después de la transferencia adoptiva. Se indica el porcentaje de células leucémicas en el gráfico de curvas de nivel de mCD5 (eje x) frente a mB220 (eje y) por encima de la ventana de adquisición en linfocitos CD5<sup>+</sup>B220<sup>low</sup>. El panel inferior representa la expresión relativa de ROR1 (eje x) usando el AcM anti-ROR1 4A5.

La Figura 2 es un diagrama que resume el análisis del AcM anti-ROR1 en la transferencia adoptiva y el injerto de esplenocitos leucémicos ROR1 XTCL1. Se procuraron a ratones Tg de ROR1 (4 ratones/grupo) 250 ug de mIgG 4A5, D10 o de control por vía i.v. el día 0. El día siguiente, se transfirieron adoptivamente por vía i.v.  $1 \times 10^7$  esplenocitos de un ratón Tg de ROR1 x TCL1. En todos los ratones se monitorizó posteriormente cada semana la expansión de linfocitos B leucémicos CD5<sup>+</sup>B220<sup>low</sup> por citometría de flujo empezando 2 semanas después de la transferencia.

La Figura 3 es una serie de gráficas que ilustran los resultados de un análisis citométrico de flujo que demuestra que los anticuerpos anti-ROR1 de la invención inhibían el desarrollo de leucemia similar a LLC en ratones Tg de ROR1. 2 semanas después de la transferencia adoptiva, se efectuaron los análisis FACS de PBMC. Los datos mostraban que el anticuerpo anti-ROR1 D10, pero no el anticuerpo anti-ROR1 4A5, inhibía notablemente la expansión de linfocitos B leucémicos CD5<sup>dim</sup>B220<sup>+</sup> y ROR1<sup>bright</sup>B220<sup>+</sup>.

La Figura 4A es una serie de gráficas que ilustran los resultados de la prueba *in vivo* en un modelo de murino de cáncer de mama humano. Los anticuerpos anti-ROR1 inhibían la metástasis de cáncer de mama en ratones con deficiencia de rag-/- g-/. Se transfirieron células de cáncer de mama 5E5 MDA-MB-231 por inyección i.v. a ratones rag-/- g-/- el día 1. Se inyectaron también en ratones con deficiencia de rag-/- g-/- por vía i.v. control isotópico o anticuerpo anti-ROR1 (4A5, D10 y 4A5 más D10) los días 1, 3, 7 y 14 a 100 mg por ratón. La Figura 4A (centro) proporciona también imágenes de procedimientos de imagenología por IVIS *in vivo* de los ratones anteriores, que se efectuaron cada semana. 5 semanas después, se sacrificaron los ratones y se efectuaron análisis de histología (Figura 4B). El anticuerpo anti-ROR1 D10 y la combinación de anticuerpos (4A5 más D10) inhibían ambos significativamente la metástasis de cáncer de mama, siendo la inhibición por D10 solo mayor que la inhibición por 4a5 solo.

La Figura 5 proporciona una comparación de secuencia codificante de nucleótidos de la cadena pesada de Ig 4A5 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana.

La Figura 6 proporciona una comparación de secuencia codificante de nucleótidos de la cadena pesada de Ig G6 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana .

La Figura 7 proporciona una comparación de secuencia codificante de nucleótidos de la cadena pesada de Ig G3 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana La Figura 8 proporciona una comparación de secuencia codificante de nucleótidos de la cadena pesada de Ig H10 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana La Figura 9 proporciona una comparación de secuencia codificante de nucleótidos de la cadena pesada de Ig D10 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana La Figura 10 es un diagrama y gráfico que representa la naturaleza altamente conservada de ROR1 humana y de murino.

La Figura 11 es una comparación nucleotídica que representa la estructura de dominio y la homología de secuencia de la proteína extracelular ROR1 humana y de murino.

La Figura 12 es un gráfico que indica el dominio extracelular con que los AcM anti-ROR1 se unen a la proteína ROR1.

La Figura 13 es un diagrama que representa las proteínas ROR1 quiméricas generadas para determinar el dominio de unión de cada uno de los AcM anti-ROR1.

La Figura 14 es un diagrama que representa las proteínas ROR1 truncadas generadas para determinar las subregiones con que se une cada uno de los AcM anti-ROR1.

La Figura 15 es un diagrama que representa los aminoácidos que se murinizaron para determinar los residuos críticos para la unión de AcM a ROR1 humana y una transferencia Western que muestra que el residuo de ácido glutámico 138 es crítico para la unión del anticuerpo D10 a ROR1 humana.

La Figura 16 es una gráfica que indica los valores de  $K_D$  para el anticuerpo D10 (Figura 16a) y 4A5 (Figura 16b).

La Figura 17 es una serie de gráficas que ilustran que el anticuerpo anti-ROR1 D10 es altamente activo en ensayos *in vivo*.

La Figura 18 es un diagrama que resume el análisis de AcM anti-ROR1 en la transferencia adoptiva y el injerto de esplenocitos leucémicos ROR1XTCL1. Se procuraron a ratones Tg de ROR1 (5 ratones/grupo) 250 ug de mIgG 4A5, D10 o de control por vía i.v. el día 0. El día siguiente, se transfirieron adoptivamente por vía i.v.  $5 \times 10^5$  esplenocitos de un ratón Tg de ROR1 x TCL1. En todos los ratones se monitorizó posteriormente cada semana la expansión de linfocitos B leucémicos  $CD5^{dull}B220^+$  por citometría de flujo empezando 2 semanas después de la transferencia.

La Figura 19 es una serie de gráficas que ilustran los resultados de un análisis citométrico de flujo de anticuerpos anti-ROR1 que inhiben el desarrollo de leucemia similar a LLC en ratones Tg de ROR1. 2 semanas después de la transferencia adoptiva, se efectuaron los análisis FACS de PBMC. Los datos mostraban que el anticuerpo anti-ROR1 D10, pero no el anticuerpo anti-ROR1 4A5, inhibía notablemente la expansión de linfocitos B leucémicos  $CD5^{dull}B220^+$  y  $ROR1^{bright}B220^+$ .

La Figura 20 es una gráfica que ilustra que el anticuerpo anti-ROR1 D10 inhibe el desarrollo y expansión de linfocitos B leucémicos ROR1 x TCL1 en la sangre de animales receptores hasta 2 semanas después de recibir la última infusión del AcM.

La Figura 21 es una representación de la rápida internalización del anticuerpo anti-ROR1 D10 en células de LLC.

La Figura 22 es una serie de gráficos que ilustran los resultados del análisis citométrico de flujo que muestran que los anticuerpos anti-ROR1 D10 y 4A5 se internalizan ambos en células de LLC. Se incubaron las células de LLC con Ac-Alex647 anti-hROR1 durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se lavaron las células y se dejaron a 4 °C o se incubaron durante 4 horas a 37 °C, seguido de citometría de flujo. Se muestra también la señal de fondo sin tinción.

La Figura 23 es una gráfica que ilustra la cinética de la internalización de los anticuerpos anti-ROR1 D10 y 4A5.

La Figura 24 es un diagrama que representa los aminoácidos que se murinizaron para determinar los residuos críticos para la unión de AcM a ROR1 humana y una transferencia Western que muestra que el residuo de isoleucina 111 es crítico para la unión del anticuerpo 4A5 a ROR1 humana.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La materia en cuestión divulgada actualmente se describe más completamente a continuación. Sin embargo, la materia en cuestión divulgada actualmente puede representarse en muchas formas diferentes y no debería considerarse limitada a las realizaciones expuestas en la presente memoria; en lugar de ello, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación satisfaga los requisitos legales aplicables. Es más, se le ocurrirán muchas modificaciones y otras realizaciones de la materia en cuestión divulgada actualmente expuesta en la presente memoria a un especialista en la técnica a la que pertenece la materia en cuestión divulgada actualmente, teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y las figuras asociadas. Por lo tanto, ha de entenderse que la materia en cuestión divulgada actualmente no ha de limitarse a las realizaciones específicas divulgadas y que se pretende que estén incluidas modificaciones y otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se produjeron de forma monoclonal anticuerpos de la invención usando técnicas como se describen anteriormente. Brevemente, los anticuerpos de origen natural son generalmente tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Experimentalmente, los anticuerpos pueden escindirse con la enzima proteolítica papaína, que causa la rotura de cada una de las cadenas pesadas, produciendo tres subunidades separadas. Las dos unidades que consisten en una cadena ligera y un fragmento de la cadena pesada aproximadamente igual a la masa de la cadena ligera se denominan fragmentos Fab (es decir, los fragmentos de unión a antígeno). La tercera unidad, consistente en dos segmentos iguales de la cadena pesada, se denomina el fragmento Fc. El fragmento Fc típicamente no está implicado en la unión antígeno-anticuerpo, pero es importante en procesos posteriores implicados en retirar del cuerpo el antígeno.

Debido a que los fragmentos Fab y  $F(ab')_2$  son menores que las moléculas de anticuerpo intactas, están disponibles

más dominios de unión a antígeno que cuando se usan moléculas de anticuerpo enteras. La escisión proteolítica de una molécula de IgG típica con papaína es conocida por producir dos fragmentos de unión a antígeno separados denominados fragmentos Fab que contienen una cadena ligera intacta ligada con una porción aminoterminal de la cadena pesada contigua a través de un ligamiento disulfuro. La porción restante de la molécula de inmunoglobulina digerida con papaína es conocida como el fragmento Fc, y consiste en las porciones carboxiterminales del anticuerpo dejadas intactas y ligadas conjuntamente a través de enlaces disulfuro. Si se digiere un anticuerpo con pepsina, se produce un fragmento conocido como F(ab')<sub>2</sub>, que carece de la región Fc pero contiene ambos dominios de unión a antígeno mantenidos juntos por enlaces disulfuro entre las cadenas ligera y pesada contiguas (como los fragmentos Fab) y también ligamientos disulfuro entre las porciones restantes de las cadenas pesadas contiguas (Handbook of Experimental Immunology. Vol 1: Immunochemistry, Weir, D. M., Editor, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986)).

Como se reconoce fácilmente por los especialistas en la técnica, pueden producirse también mediante procedimientos bien conocidos en la técnica anticuerpos alterados (*p.ej.*, quiméricos, humanizados, injertados con CDR, bifuncionales, dímeros polipeptídicos de anticuerpo (*es decir*, una asociación de dos componentes de cadena polipeptídica de un anticuerpo, *p.ej.*, un brazo de un anticuerpo que incluye una cadena pesada y una cadena ligera, o un fragmento Fab que incluye los dominios de anticuerpo VL, CH, CL y CH, o un fragmento Fv que comprende un dominio VL y un dominio VH), anticuerpos monocatenarios (*p.ej.*, un fragmento scFv (*es decir*, Fv monocatenario) que incluye un dominio VL ligado a un dominio VH por un ligador, y similares).

La tecnología de anticuerpos monoclonales (AcM) puede usarse para obtener AcM de ROR1. Brevemente, se producen hibridomas usando células de bazo de ratones inmunizados con antígenos de ROR1. Se fusionan las células de bazo de cada ratón inmunizado con células Sp 2/0 de mieloma de ratón, por ejemplo usando el procedimiento de fusión con polietilenglicol de Galfre, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.*, 73:3-46 (1981). Se llevan a cabo el crecimiento de hibridomas, la selección en medio HAT, la clonación y cribado de clones contra antígenos usando metodología estándar (Galfre, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.*, 73:3-46 (1981)):

Se inyectan clones seleccionados por HAT en ratones para producir grandes cantidades de AcM en asicitis como se describe por Galfre, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.*, 73:3-46 (1981), que puede purificarse usando cromatografía en columna de proteína A (BioRad, Hercules, Calif.). Los AcM se seleccionan basándose en (a) su especificidad por ROR1, (b) una alta afinidad de unión, (c) el isotipo y (d) la estabilidad.

Los AcM pueden cribarse o ensayarse la especificidad por ROR1 usando cualquiera de una variedad de técnicas estándares, incluyendo transferencia Western (Koren, E. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 876:91-100 (1986)) y ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) (Koren, E. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 876:91-100 (1986)).

Pueden generarse formas humanizadas de anticuerpos de ratón ligando las regiones de CDR de anticuerpos no humanos con regiones constantes humanas mediante técnicas de ADN recombinante (véanse, *p.ej.*, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989 y WO 90/0786). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse usando procedimientos de presentación en fago (véanse, *p.ej.*, Dower *et al.*, WO 91/17271; McCafferty *et al.*, WO 92/01047). En estos procedimientos, se producen colecciones de fagos en que los miembros presentan diferentes anticuerpos sobre sus superficies externas. Los anticuerpos se presentan habitualmente como fragmentos Fv o Fab. Puede seleccionarse el fago que presenta anticuerpos con una especificidad deseada mediante enriquecimiento por afinidad.

Pueden seleccionarse anticuerpos humanos por experimentos de unión competitiva, o de otro modo, para tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular. Usando estas técnicas, un anticuerpo de ROR1 humanizado que tiene el dominio de región constante de IgG1 humana y el dominio de región constante de cadena ligera kappa humana con las regiones variables de cadena pesada y ligera de ratón. El anticuerpo humanizado tiene la especificidad de unión de un AcM de ROR1 de ratón, específicamente el AcM 4A5 descrito en los Ejemplos 4 y 5.

Puede ser deseable producir y usar fragmentos funcionales de un AcM para una aplicación particular. La estructura básica bien conocida de una molécula de IgG típica es una molécula en forma de Y tetramérica simétrica por aproximadamente 150.000 a 200.000 daltones consistente en dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (que contienen aproximadamente 220 aminoácidos) y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (que contienen aproximadamente 440 aminoácidos). Las cadenas pesadas están ligadas entre sí a través de al menos un enlace disulfuro. Cada cadena ligera está ligada con una cadena pesada contigua por un ligamiento disulfuro. Está localizado un sitio o dominio de unión a antígeno en cada brazo de la molécula de anticuerpo en forma de Y, y está formado entre las regiones aminotermiales de cada par de cadenas ligera y pesada ligadas por disulfuro. Estas

regiones aminotermiales de las cadenas ligera y pesada consisten en aproximadamente sus primeros 110 aminoácidos aminotermiales y son conocidas como las regiones variables de las cadenas ligera y pesada. Además, dentro de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, hay regiones hipervariables que contienen tramos de secuencias aminoácidas conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR son responsables de la especificidad del anticuerpo por un sitio particular en una molécula de antígeno denominado epítipo. Por tanto, la molécula de IgG típica es divalente al poder unirse a dos moléculas de antígeno, debido a que cada sitio de unión a antígeno es capaz de unirse al epítipo específico de cada molécula de antígeno. Las regiones carboxitermiales de las cadenas ligera y pesada son similares o idénticas a aquellas de otras moléculas de anticuerpo y se denominan regiones constantes. La secuencia aminoácida de la región constante de las cadenas pesadas de un anticuerpo particular define cuál clase de anticuerpo es, por ejemplo IgG, IgD, IgE, IgA o IgM. Algunas clases de anticuerpos contienen dos o más anticuerpos idénticos asociados entre sí en disposiciones de unión a antígeno multivalentes.

Pueden usarse fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> de AcM que se unen a ROR1 en lugar de AcM enteros. Debido a que los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> son menores que las moléculas de anticuerpo intactas, están disponibles más dominios de unión a antígeno que cuando se usan moléculas de anticuerpo enteras. La escisión proteolítica de una molécula de IgG típica con papaína es conocida por producir dos fragmentos de unión a antígeno separados denominados fragmentos Fab que contienen una cadena ligera intacta ligada con una porción aminoterminal de la cadena pesada contigua a través de un ligamiento disulfuro. La porción restante de la molécula de inmunoglobulina digerida con papaína es conocida como el fragmento Fc, y consiste en las porciones carboxitermiales del anticuerpo dejadas intactas y ligadas conjuntamente a través de enlaces disulfuro. Si se digiere un anticuerpo con pepsina, se produce un fragmento conocido como F(ab')<sub>2</sub>, que carece de la región Fc pero contiene ambos dominios de unión a antígeno mantenidos juntos por enlaces disulfuro entre las cadenas ligera y pesada contiguas (como los fragmentos Fab) y también ligamientos disulfuro entre las porciones restantes de las cadenas pesadas contiguas (Handbook of Experimental Immunology. Con respecto a anticuerpos particulares, "unión específica" hace referencia a la unión de anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una K<sub>D</sub> de aproximadamente 10<sup>-8</sup> M o menor, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad (expresada por K<sub>D</sub>) que es al menos 10 veces menor, y preferiblemente al menos 100 veces menor, que su afinidad de unión por un antígeno no específico (p.ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Como alternativa, el anticuerpo puede unirse con una afinidad correspondiente a una K<sub>A</sub> de aproximadamente 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> o de aproximadamente 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>, o de 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> o mayor, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad (expresada por K<sub>A</sub>) que es al menos 10 veces mayor, y preferiblemente al menos 100 veces mayor, que su afinidad de unión por un antígeno no específico (p.ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

También, la referencia a "un anticuerpo que tiene especificidad de unión por la proteína ROR1" incluye fragmentos de anticuerpo que tienen al menos un 90 o 95 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias polipeptídicas divulgadas en las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 y 20, incluyendo variantes modificadas por mutación para mejorar la utilidad de las mismas (p.ej., capacidad mejorada de orientarse a tipos celulares específicos y similares). Tales variantes incluyen aquellas donde se introducen una o más sustituciones conservativas en la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo.

Tales variantes incluyen aquellas donde se introducen una o más sustituciones en la secuencia nucleotídica de cadena pesada y/o la secuencia nucleotídica de cadena ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones, la variante tiene una cadena ligera y/o una cadena pesada que tiene una secuencia nucleotídica al menos un 80 % o al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a las secuencias nucleotídicas expuestas en las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 17 y 19.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican rasgos estructurales de los anticuerpos de la invención incluyen aquellas cuyas secuencias se exponen a continuación. Cada secuencia polinucleotídica es seguida por la secuencia aminoácida del polipéptido codificado. Las secuencias de cadena ligera que se considera que son "correspondientes" a secuencias de cadena pesada son aquellas enumeradas por ser del mismo anticuerpo; es decir, las secuencias de cadena pesada de F2 corresponden a las secuencias de cadena ligera de F2, las secuencias de cadena pesada de D10 corresponden a las secuencias de cadena ligera de D10 y así.

la SEC ID N°: 1: Secuencia de codificación de la región variable de cadena pesada del AcM anti-ROR1 4A5 de ratón

GAAGTGAAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATT

CACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGAGATTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGG  
TCGCATCCATTAGTCGTG

GTGGTACCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGATAATGTC  
AGGAACATCCTGTACCTG

CAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGGAAGATATGATTACGA  
CGGGTACTATGCAATGGA

CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

la SEC ID N°: 2: Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena pesada del AcM anti-ROR1 4A5 de ratón:

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQIPEKRLEWVASISRGGTTYPPDS  
VKGRFTISRDNVRNILYL

5 QMSSLRSEDAMYYCGRYDYGYYAMDYWGQTSVTVSS

la SEC ID N°: 3: Secuencia de codificación de la región variable de cadena ligera del AcM anti-ROR1 4A5 de ratón:

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT  
CACTTGCAAGGCGAGTCC

GGACATTAATAGCTATTTAAGCTGGTTCAGCAGAAAACCAGGAAATCTCCTAAGACCCTGA  
TCTATCGTGCAAACAGAT

TGGTTGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCGGTGGATCTGGGCAAGATTATCTCTCACC  
ATCAACAGCCTGGAGTAT

GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAATTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG  
GACCAAGCTGAAAATGAA

AC

10

la SEC ID N°: 4: Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena ligera del AcM anti-ROR1 4A5 de ratón:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSTRF  
SGGGSGQDYSLTINSLEY

EDMGIYYCLQYDEFPTYTFGGGTKLEMK

15 la SEC ID N°: 5: Secuencia de codificación de la región variable de cadena pesada de los AcM anti-ROR1 F2, F12 y G6 de ratón:

GAGGTCCAGCTACAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATC  
CTGCAAGGCTTCTGGTTT

CGCATTCACTGGCTACAACATGAACTGGGTGAAACAGACCAATGGAAAGAGCCTTGAGTGGA  
TTGGAAGTATTGATCCTT

ACTATGGTGGTTCTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAA  
TCCTCCAGCACAGCCTAC

ATGCAACTCAAGAGCCTCACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATCCCCGGG  
GGGGGACTATGCTATGGA

CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

la SEC ID N°: 6: Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena pesada de los AcM anti-ROR1 F2, F12 y G6 de ratón:

5

EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFVFTGYNMNVKQTNPKSLEWIGSIDPYYGGSTYNQ  
KFKDKATLTVDKSSSTAY

MQLKSLTSDDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGQGTSTVTVSS

la SEC ID N°: 7: Secuencia de codificación de la región variable de cadena ligera de los AcM anti-ROR1 F2, F12 y G6 de ratón:

10

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTGTAGGAGAGAGAGTCACTAT  
CACTTGTAAGGCGAGTCA

GGGCATTAATAGCTATTTCAGGCTGGTTCCAGCAGAAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGA  
TTTATCGTGAAATAGAT

TGGTGGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATFCTCTCACC  
ATCAGCAGCCTGGAGTAT

GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG  
GACCAAGCTGGAAATAAA

AC

la SEC ID N°: 8: Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena ligera de los AcM anti-ROR1 F2, F12 y G6 de ratón:

15

DIKMTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINYSYSGWFQQKPGKSPKTLIYRGNRLVDGVPSRF  
SGSGSGQDYSLTISSLEY

EDMGIYYCLQYDEFPPYTFGGGTKLEIK

la SEC ID N°: 9 Secuencia de codificación de la región variable de cadena pesada del AcM anti-ROR1 G3 de ratón:

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGCTGTC  
CTGCAAGGCTTCTGGCTA

CAACTTACCAACTACTGGATAAACTGGGTGAAGCTGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGA  
TTGGAGAAATTTATCCTG

GTAGTGGTAGTACTAATTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACA  
TCCTCCAGCACAGCCTAC

ATGCAACTCAGCAGCCTGGCATCTGAAGACTCTGCTCTCTATTACTGTGCAAGAGATGGTAA  
CTACTATGCTATGGACTA  
CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

5

la SEC ID N°: 10 Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena pesada del AcM anti-ROR1 G3 de ratón:

QVQLQQPGAELVKPGTQSVKLSCKASGYNFTNYWINWVKLRPGQGLEWIGEIYPSGSGSTNYNE  
KFKSKATLTADTSSSTAY

10

MQLSSLASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQGTSVTVSS

la SEC ID N°: 11 Secuencia de codificación de la región variable de cadena ligera del AcM anti-ROR1 G3 de ratónCadena ligera:

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCAT  
CACTTGCAGGGCAAGTCA

GGACATTAACAATTATTTAAACTGGTATCAACAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGA  
TCTACTACACATCAGCAT

TACTACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTTCTCTCACC  
ATTAGCAACCTGGAACAA

GAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCTCCTCCGTACACGTTCCGGAGG  
GGGGACCAAGCTGGAAAT

15

AAAAC

la SEC ID N°: 12 Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena ligera del AcM anti-ROR1 G3 de ratón Cadena ligera:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSALHSGVPSRF  
SGSGSGTDYSLTISNLEQ

EDIATYFCQQGNTLPPYTFGGGTKLEIK

5

la SEC ID N°: 13 Secuencia de codificación de la región variable de cadena pesada del AcM anti-ROR1 D10 de ratón:

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGACTCTGTCCATCAC  
TTGCACTGTCTCTGGGTT

TTCATTAACCAGTTATGGTGTACACTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGC  
TGGGAGTAATATGGGCTG

GTGGATTCAAAATATAATTCCGGCTCTCAAGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCC  
AAGAGCCAAGTTCTCTTA

AAAATGACCAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAGGAGAGGTAGTTC  
CTATTCTATGGACTATTG

GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

10

la SEC ID N°: 14: Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena pesada del AcM anti-ROR1 D10 de ratón:

QVQLKESGPGLVAPSQTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYNSA  
LKSRLSISKDNSKSQVLL

KMTSLQTDDETAMYYCARRGSSYSMDYWGQTSVTVSS

15 la SEC ID N°: 15 Secuencia de codificación de la región variable de cadena ligera del AcM anti-ROR1 D10 de ratón Cadena ligera:

GAAATTGTGCTCTCTCAGTCTCCAGCCATCACAGCTGCATCTCTGGGCCAAAAGGTCACCAT  
CACCTGCAGTGCCAGTTC

AAATGTAAGTTACATCCACTGGTACCAGCAGAGGTCAGGCACCTCCCCAGACCATGGATTT  
ATGAAATATCCAAACTGG

CTTCTGGAGTCCCAGTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATC  
AGCAGCATGGAGGCTGAA

GATGCTGCCATTTATTATTGTCAGCAGTGGAAATTATCCTCTTATCACGTTCCGGCTCGGGGAC  
AAAGTTGGAAATACAA

la SEC ID N°: 16 Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena ligera del AcM anti-ROR1 D10 de ratón Cadena ligera:

5

EIVLSQSPAITAASLGQKVITITCSASSNVSYIHQYQQRSGTSPRPWIYELSKLASGVPVRFSS  
GSGSGTSYSLTISSMEAE

DAAIYYCQQWNYPLITFGSGTKLEIQ

la SEC ID N°: 17: Secuencia de codificación de la región variable de cadena pesada de los AcM anti-ROR1 H10 y G11 de ratón:

10

GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATT

CACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGACACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGG  
TCGCTTCCATTAGTACTG

GTGCTAGCGCCTACTTCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCC  
AGGAACATCCTGTACCTG

CAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTATTGTGCAAGGATTACTACGTC  
TACCTGGTACTTTCGATGT

CTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

la SEC ID N°: 18: Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena pesada de los AcM anti-ROR1 H10 y G11 de ratón:

15

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISTGASAYFPDS  
VKGRFTISRDNARNILYL

QMSSLRSEDAMYYCARITTTSTWYFDVWGAGTTVTVSS

la SEC ID N°: 19: Secuencia de codificación de la región variable de cadena ligera de los AcM H10 y G11 anti-ROR1 de ratón:

20

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT  
 CACTTGCAAGGCGAGTCA  
 GGACATTAATAGTTATTTAAGCTGGTTCAGCAGAAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGA  
 TCTATCGTGCAAACAGAT  
 TGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACC  
 ATCAGCAGCCTGGAGTAT  
 GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGG  
 GACCAAGCTGGAAATAAA  
 AC

la SEC ID N°: 20: Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena ligera de los AcM anti-ROR1 H10 y G11 de ratón:

5  
 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF  
 SGSGSGQDYSLTISSLEY  
 EDMGIYYCLOYDEFFPYTFGGGTKLEIK

10 En un aspecto, se proporcionan anticuerpos en que una cadena pesada está codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 13 y una cadena ligera está codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 15.

Se divulga también un anticuerpo que contiene una cadena pesada codificada por la secuencia polinucleotídica de LA SEC ID N°: 1 y una cadena ligera codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 3.

15 Se divulgan también anticuerpos que tienen una cadena pesada codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 5 y una cadena ligera codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 7 o por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 9 y una cadena ligera codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 11; o por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 15 y una cadena ligera codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEC ID N°: 17.

20 En otro aspecto, se proporcionan anticuerpos que contienen una cadena pesada con la secuencia polipeptídica de LA SEC ID N°: 14 y una cadena ligera con la secuencia polipeptídica de la SEC ID N°: 16.

25 Se divulgan también anticuerpos que contienen una cadena pesada con la secuencia polipeptídica de la SEC ID N°: 2 y una cadena ligera con la secuencia polipeptídica de la SEC ID N°: 4.

30 En un aspecto de la divulgación, se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo que se une específicamente a proteína ROR1 que (a) comprenden una región de cadena pesada codificada por polinucleótidos que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo consistente en las la SEC ID N°: 1, 5, 9, 13 o 17, (b) comprenden una correspondiente región de cadena ligera codificada por polinucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo consistente en las la SEC ID N°: 3, 7, 11, 15 o 19 y (c) se unen específicamente a cualquiera del extremo 3' o la porción media de la región similar a Ig del dominio extracelular de la proteína ROR1 humana o de murino.

35 Se divulgan también anticuerpos que se unen a residuos en el medio de la región similar a Ig del dominio extracelular de la proteína ROR1 humana o de murino (aminoácidos 1-147 en la molécula humana). En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención se unen a los aminoácidos 70-130 de ROR1 humana. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen 4A5, G11, H10 y G3.

40 Como alternativa o adicionalmente, un residuo correspondiente al encontrado en el dominio extracelular de la proteína ROR1 humana en posición 111 es crítico para la actividad de unión de los anticuerpos.

Se divulgan adicionalmente anticuerpos que se unen a residuos en la región 3'-similar a Ig y la región ligadora entre

el dominio similar a Ig y el dominio CRD de la proteína ROR1 humana o de murino (aminoácidos 1-165 en la molécula humana). En un aspecto, los anticuerpos de la presente divulgación se unen a los aminoácidos 130-165 de ROR1 humana. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen D10, F2, F12 y G6.

- 5 Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos se unen a un residuo de ácido glutámico correspondiente al encontrado en el dominio extracelular de la proteína ROR1 humana en posición 138.

Como alternativa o adicionalmente, un residuo correspondiente al encontrado en el dominio extracelular de la proteína ROR1 humana en posición 138 es crítico para la actividad de unión de los anticuerpos.

10

Como alternativa o adicionalmente, el anticuerpo codificado tiene actividad *in vivo* en la reducción de la carga de células leucémicas o linfómicas en un modelo animal aceptado en la técnica a una tasa de 2-8 veces, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces la del anticuerpo anti-ROR1 humano de tipo silvestre o anticuerpo monoclonal 4A5 (divulgado en la presente memoria).

15

Como alternativa, o adicionalmente, el anticuerpo codificado tiene actividad *in vivo* en la inhibición de la expansión de linfocitos B leucémicos CD5<sup>dull</sup>B220<sup>+</sup> y ROR1<sup>bright</sup>B220<sup>+</sup>.

20

Como alternativa o adicionalmente, el anticuerpo codificado se internaliza en células leucémicas o linfómicas a una tasa de al menos 2 veces, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces la del anticuerpo monoclonal 4A5. Tales anticuerpos son particularmente útiles como vehículos para el suministro de fármaco a una célula diana.

25

Es un ejemplo de un anticuerpo que posee todas las características funcionales anteriormente mencionadas D10, que tiene una región de cadena pesada codificada por la la SEC ID N°: 13 y una región de cadena ligera codificada por la la SEC ID N°: 15.

30

En otro aspecto, se divulgan polipéptidos que consisten en o comprenden anticuerpos que se unen específicamente a la proteína ROR1 y (a) comprenden una región de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14 o 18, (b) comprenden una correspondiente región de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de la SEC ID N°: 4, 8, 12, 16 o 20 y (c) se unen específicamente a cualquiera del extremo 3' o la porción media de la región similar a Ig del dominio extracelular de la proteína ROR1 humana o de murino. En un aspecto, el polipéptido aislado es un anticuerpo. En un aspecto adicional, el polipéptido es un Fab o F(ab)'2.

35

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención puede contener adicionalmente un marcaje detectable. Tales marcajes son conocidos en la técnica e incluyen radioisótopos y marcajes fluorescentes. Como tal, la internalización de un compuesto que evidencie el paso mediante transportadores puede detectarse detectando la señal de una célula de cualquiera de una variedad de indicadores. El indicador puede ser un marcaje tal como un fluoróforo, un cromóforo o un radioisótopo. Puede usarse también la imagenología confocal para detectar la internalización de un marcaje, ya que proporciona suficiente resolución espacial para distinguir entre fluorescencia sobre una superficie celular y fluorescencia en una célula; como alternativa, puede usarse la imagenología confocal para rastrear el movimiento de los compuestos con el tiempo. En otro enfoque, se detecta la internalización de un compuesto usando un indicador que es un sustrato de una enzima expresada en una célula. Una vez se internaliza el complejo, se metaboliza el sustrato por la enzima y genera una señal óptica o descomposición radiactiva que es indicativa de la captación. La emisión de luz puede monitorizarse por instrumentos comerciales basados en PMT o por sistemas de imagenología basados en CCD. Además, se emplean también procedimientos de ensayo que utilizan detección por LCMS de los compuestos transportados o de señales electrofisiológicas indicativas de la actividad de transporte.

40

En ciertas realizaciones terapéuticas, el anticuerpo seleccionado puede administrarse solo, en combinación con otro anticuerpo de la invención o con uno o más agentes terapéuticos combinatorios para tratar un cáncer de ROR1. Cuando se administran uno o más de los anticuerpos descritos en la presente memoria como agentes terapéuticos, pueden ejercer un efecto beneficioso en el sujeto mediante una variedad de mecanismos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se purifican anticuerpos que se unen específicamente a ROR1 y se administran a un paciente para neutralizar una o más formas de ROR1, para bloquear una o más actividades de ROR1 o para bloquear o inhibir una interacción de una o más formas de ROR1 con otra biomolécula; p.ej., para tratar LLCL u otros cánceres de ROR1. Todos tales procedimientos terapéuticos se practican para el suministro de una dosificación terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que contiene los anticuerpos y agentes terapéuticos, que puede determinarse por un farmacólogo o facultativo especialista en inmunoterapia de cáncer humano.

50

60

En una realización, puede usarse la presente invención en un procedimiento para el tratamiento de cáncer mediante la administración a un sujeto humano necesitado de ello de una dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

- 5 En otra realización, puede usarse la presente invención en un procedimiento para el tratamiento de cáncer que comprende la administración a un sujeto humano necesitado de ello de una dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Ventajosamente, tales procedimientos proporcionan una reducción de la carga de células leucémicas o linfólicas (como se demuestra en y equivalente a un modelo animal aceptado en la técnica) de 2-8 veces, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces la del anticuerpo anti-ROR1 humano de tipo silvestre o anticuerpo monoclonal 4A5 (divulgado en la presente memoria).

Tales procedimientos proporcionan adicionalmente un enfoque terapéutico para inhibir la expansión de linfocitos B leucémicos CD5<sup>dull</sup>B220<sup>+</sup> y ROR1<sup>bright</sup>B220<sup>+</sup>.

Como se discute en la presente memoria, los anticuerpos de la invención pueden incluir anticuerpos humanizados y pueden combinarse para uso terapéutico con ingredientes activos o inertes adicionales, p.ej., en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales, p.ej., adyuvantes inmunogénicos, y opcionalmente con moléculas complementarias o activas combinatoriamente tales como fármacos antiinflamatorios y antifibrinolíticos. Los anticuerpos que se internalizan fácilmente en células, como se demuestra en la presente memoria con respecto al anticuerpo D10, son también de uso particular como vehículos para el suministro de fármaco a células diana (por ejemplo, como se muestra en las Figuras 21-23). Los especialistas en la técnica estarán familiarizados con los procedimientos para la producción de conjugados de anticuerpo-fármaco útiles en tales protocolos de suministro de fármaco.

Al llevar a cabo diversos procedimientos de ensayo, diagnóstico y terapéuticos, es deseable preparar por adelantado kits que comprenden una combinación de anticuerpos como se describen en la presente memoria con otros materiales. Por ejemplo, en el caso de inmunoensayos enzimáticos de sándwich, los kits pueden contener un anticuerpo que se une específicamente a ROR1 ligado opcionalmente con un vehículo apropiado, una preparación liofilizada o una solución de un anticuerpo monoclonal marcado con enzima que puede unirse al mismo antígeno junto con el anticuerpo monoclonal o de un anticuerpo policlonal marcado con la enzima de la misma manera, una solución patrón de ROR1 purificada, una solución tampón, una solución de lavado, pipetas, un envase de reacción y similares. Además, los kits incluyen opcionalmente materiales de etiquetado y/o explicativos que proporcionan instrucciones (es decir, protocolos) para la práctica de los procedimientos descritos en la presente memoria en un entorno de ensayo. Aunque los materiales explicativos comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no están limitados a ellos. Se contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (p.ej., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (p.ej., CD ROM) y similares. Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan tales materiales explicativos.

En general, un procedimiento *in vitro* de diagnóstico de un cáncer de ROR1 comprenderá poner en contacto las presuntas células cancerosas de un sujeto humano con un anticuerpo de acuerdo con la invención, y detectar la unión con ROR1 expresada en dichas células en comparación con la expresión en células no cancerosas humanas postembrionarias. Todos tales procedimientos de diagnóstico se practican mediante el suministro de una cantidad con efecto de diagnóstico de anticuerpos de acuerdo con la invención, que puede determinarse por un especialista en diagnóstico o ingeniero de diagnóstico *in vivo* especializado en el diagnóstico de cáncer humano.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

50

#### **EJEMPLO 1: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-ROR1**

Para la producción de AcM generados por hibridoma, se inocularon ratones con ADN, proteína y constructos adenovíricos que expresan la porción extracelular (AA 1-406) de la proteína ROR1 que incluye los dominios similar a Ig, CRD y Kringle y regiones ligadoras adyacentes (Figuras 10-11). Debido al alto grado de homología entre las moléculas de murino y humana, se coinyectaron una variedad de citocinas y agentes inmunoestimulantes, tales como adyuvante completo de Freund, para maximizar la generación de anticuerpos anti-ROR1 humana. Se generaron AcM generados por hibridoma y se cribó la unión a ROR1 humana y de murino. Es un ejemplo de AcM derivado de hibridoma D10.

60

**EJEMPLO 2 GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-ROR1 USANDO PRESENTACIÓN EN FAGO**

Se generó un segundo conjunto de anticuerpos mediante el uso de una colección en fago mejorada patentada (Alere, Inc. San Diego). Estos anticuerpos anti-ROR1 humana se unen a epítomos que cubren toda la longitud del dominio extracelular de la proteína ROR1 (Figura 12). Es un ejemplo de anticuerpo anti-ROR1 derivado de presentación en fago 4A5.

**EJEMPLO 3 ANÁLISIS IN VITRO DE ANTICUERPOS ANTI-ROR1**

10 Se cribó en los anticuerpos generados por hibridomas o presentación en fago la unión a ROR1 humana y de murino. Se determinó que los anticuerpos anti-ROR1 D10 y 4A5 se unían solo a ROR1 humana y no reaccionaban de forma cruzada con ROR1 de murino.

**EJEMPLO 4 DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN PARA ANTICUERPOS ANTI-ROR1**

15 Debido a que los AcM anti-ROR1 son específicos de especie, se generaron una serie de proteínas quiméricas que se usaron para determinar el sitio de unión de cada uno de los AcM anti-ROR1 (Figura 13). Como cribado de segundo nivel, se generaron una serie de constructos de delección para determinar el dominio extracelular de ROR1 real al que se unen los AcM. Una vez se identificó el dominio de unión, se generaron moléculas de ROR1 quiméricas truncadas para identificar subregiones específicas que se reconocen por los AcM anti-ROR1 humana (Figura 14).  
20 Como etapa final, se determinaron los aminoácidos reales diana de estos anticuerpos. Para este cribado final, se generaron aminoácidos humanos murinizados en los fragmentos de subdominio para determinar los residuos críticos requeridos para la unión de AcM (Figura 15). A partir de este paradigma de cribado, se determinaron los subdominios de unión para los AcM (Figura 15). Se determinó que el AcM anti-ROR1 humana D10 requería que el  
25 residuo de ácido glutámico en posición 138 se uniera al dominio similar a Ig de la molécula de ROR1 humana. Cuando se reemplaza este aminoácido por el residuo de lisina de la molécula de murino, la molécula D10 no se une más a la proteína ROR1.

De manera similar, se determinó que el AcM anti-ROR1 humana 4A5 requería que el residuo de isoleucina en  
30 posición 111 se uniera a la molécula de ROR1 humana (Figura 24). Cuando se reemplaza este aminoácido por el residuo de asparagina de la molécula de murino, la molécula 4A5 no se une más a la proteína ROR1. Se determinó también que los anticuerpos anti-ROR1 G11, H10 y G3 se unen a la misma región que 4A5.

Usando técnicas de bloqueo cruzado estándares, se determinaron los sitios de unión para los anticuerpos anti-  
35 ROR1 F2, F12 y G6. Estos experimentos determinaron que los anticuerpos F2, F12 y G6 bloquean de forma cruzada el anticuerpo anti-ROR1 D10, indicando que comparten un sitio de unión.

**EJEMPLO 5 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE  $K_D$  PARA LOS ANTICUERPOS ANTI-ROR1 D10 Y 4A5**

40 Se determinaron los valores de  $K_D$  para los anticuerpos anti-ROR1 usando técnicas estándares. Se determinó que la  $K_D$  para el anticuerpo D10 era de 40 nM y para el anticuerpo 4A5 era de 4 nM (Figuras 16A y B).

**EJEMPLO 6 ANÁLISIS IN VIVO DE ANTICUERPOS ANTI-ROR1**

45 Se valoró el AcM D10 en varios modelos in vivo. En un modelo de actividad dependiente de nicho xenográfico *in vivo* de murino, se administraron dos dosis de AcM a 10 mg/kg contra 4 células de LLC de paciente primario en 76 ratones. Como se muestra en la Figura 17, el AcM D10 eliminaba sustancialmente las células de LLC del paciente de manera dependiente de la dosis. En contraposición, el AcM 4A5 tenía una actividad mínima en estos estudios aunque la kDa de este AcM sea 10 veces mayor (4 frente a 40) que en el AcM D10.

50 Además de este modelo de actividad, se ensayó también el AcM D10 en un modelo de ratón transgénico inmunocompetente que genera espontáneamente células leucémicas que expresan la proteína ROR1 humana (Figuras 18-20). Se administraron los AcM específicos de ROR1 D10 y 4A5 o anticuerpos de IgG de control (10 mg/kg) antes y después de la transferencia adoptiva de linfocitos B de LLC ROR1xTCL1 en ratones Balb C. El AcM  
55 D10, pero no el IgG de control o 4A5, era capaz de inhibir el desarrollo y expansión de linfocitos B leucémicos ROR1xTCL en la sangre de animales receptores hasta dos semanas después de recibir la última infusión de AcM.

Junto con la actividad antileucémica de este AcM, se ha mostrado también que el anticuerpo anti-ROR1 D10 se  
60 internaliza en células de LLC de paciente y líneas celulares de leucemia y linfoma de linfocitos B a una mayor tasa y grado que otros AcM anti-ROR1 que se unen a otros sitios antigénicos en la porción extracelular de la proteína

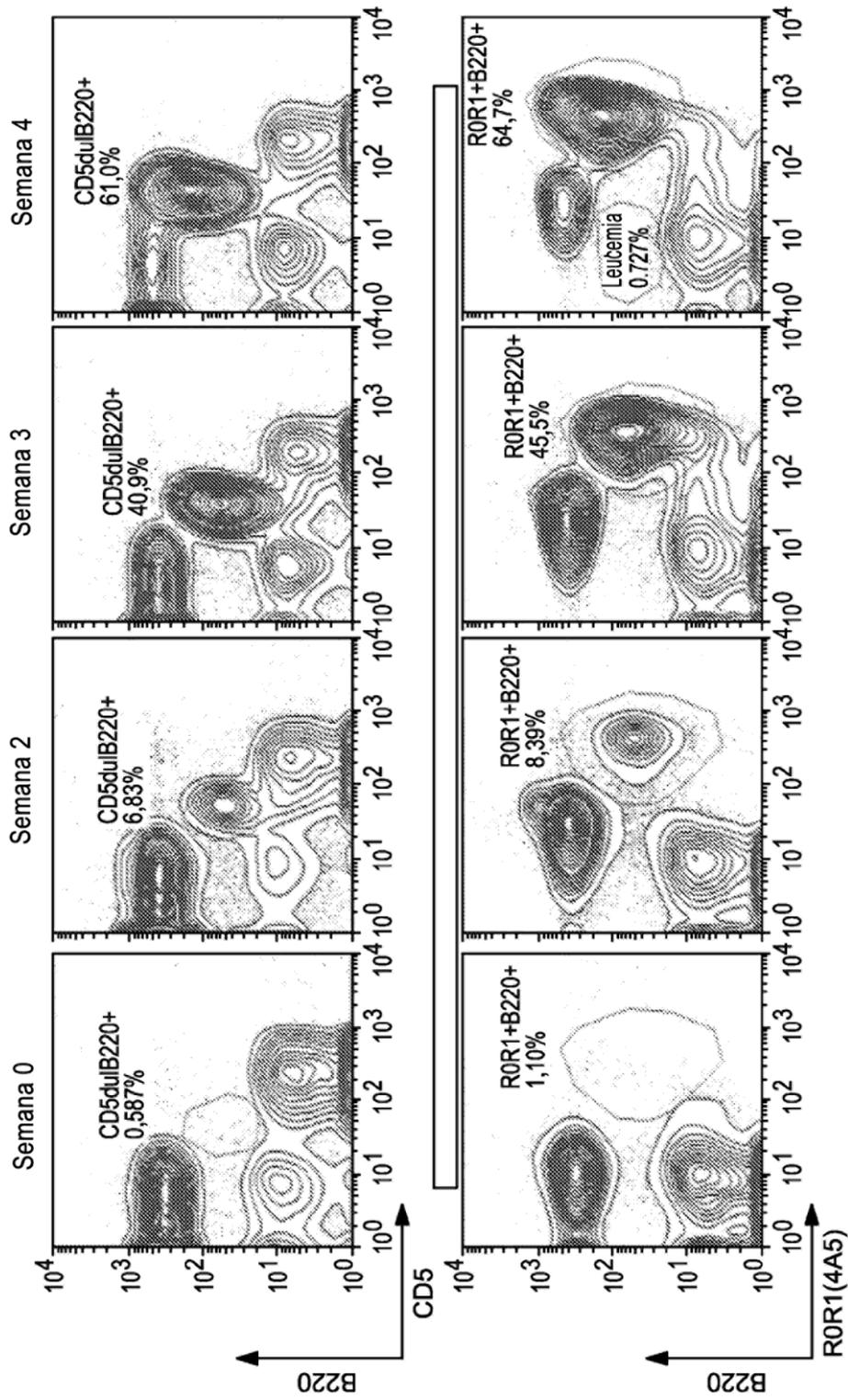
ROR1 (Figuras 21-23). Debido a la ausencia de la proteína ROR1 en tejidos postparto y a su rápida tasa de internalización, el AcM D10 puede servir como una excelente proteína vehículo para fármacos; por ejemplo, para uso en citotoxicidad mediada por el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Basándose en estos hallazgos preclínicos, el AcM D10 tiene potencial para tener actividad terapéutica contra leucemias, linfomas y cánceres tumorales sólidos que expresan ROR1 como terapia orientada y/o vehículo de fármaco conjugado.

Aunque la materia en cuestión anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, se entenderá por los especialistas en la técnica que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

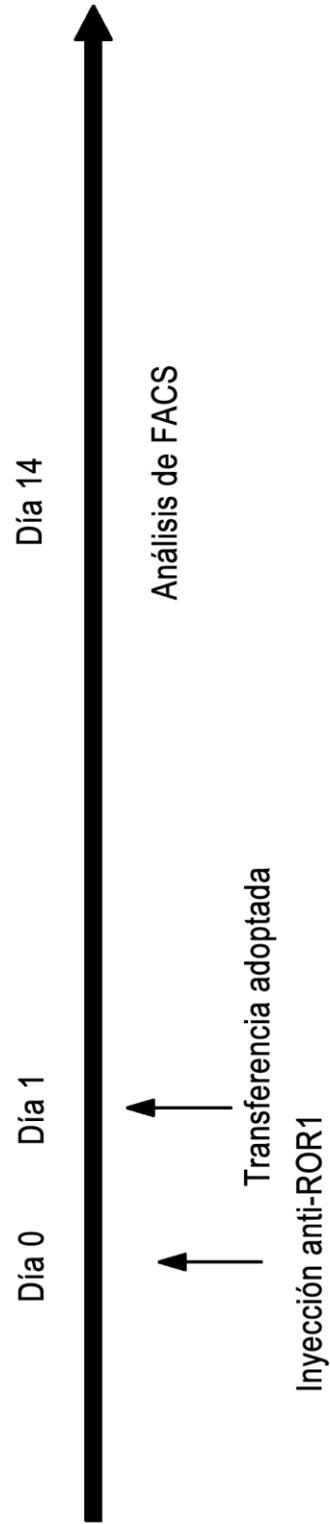
10

## REIVINDICACIONES

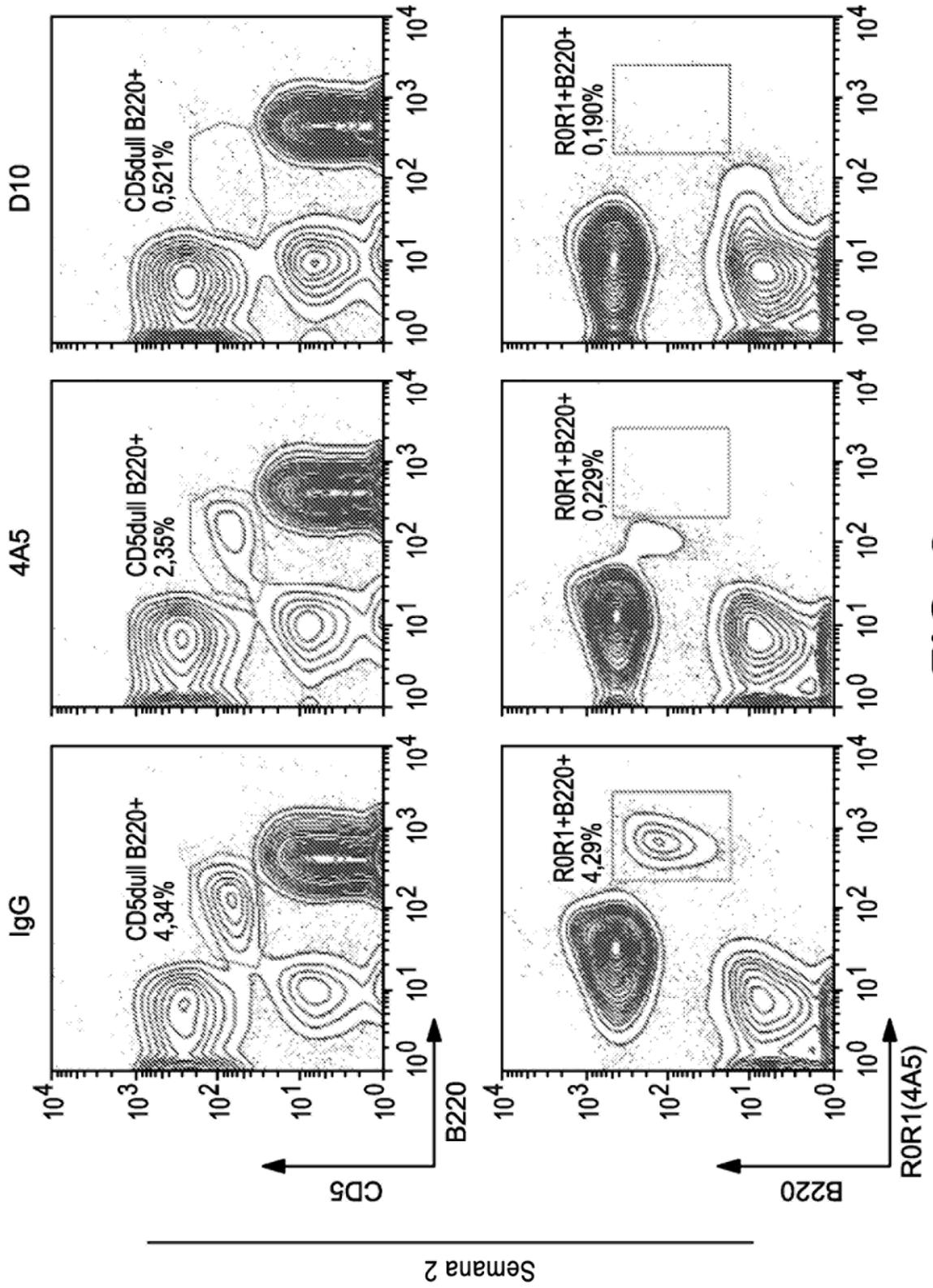
1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína ROR-1 humana en células cancerosas y comprende una región variable de cadena pesada codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 13, y una correspondiente región variable de cadena ligera codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 15, donde el anticuerpo se une a la región similar a Ig del dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana desde la posición 1-147, o a los residuos 130-160 en la región similar a Ig y región ligadora adyacente entre el dominio similar a Ig y el dominio CDR del dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana en posición 1-165.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde se une adicionalmente a un residuo de ácido glutámico correspondiente al encontrado en el dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana en posición 138.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde reduce adicionalmente la carga de células leucémicas o linfómicas en un modelo animal aceptado en la técnica a una tasa de 2-8 veces, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces, la de un anticuerpo monoclonal que comprende regiones de cadena pesada y ligera codificadas por la secuencia nucleotídica de la SEC ID N°: 1 (cadena pesada) y la secuencia nucleotídica de la SEC ID N°: 3 (cadena ligera).
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde inhibe adicionalmente la expansión de linfocitos B leucémicos CD5<sup>dull</sup>B220<sup>+</sup> y ROR1<sup>bright</sup>B220<sup>+</sup>.
5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde se internaliza adicionalmente en células leucémicas o linfómicas a una tasa de al menos 2 veces, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces la de un anticuerpo monoclonal que comprende regiones de cadena pesada y ligera codificadas por la secuencia nucleotídica de la SEC ID N°: 1 (cadena pesada) y la secuencia nucleotídica de la SEC ID N°: 3 (cadena ligera).
6. Una composición de anticuerpo anti-ROR1 farmacéuticamente aceptable que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde un residuo de ácido glutámico correspondiente al encontrado en el dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana en posición 138 es crítico para la unión del anticuerpo a ROR-1.
8. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
9. Un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera codificadas por la secuencia nucleotídica de la SEC ID N°: 13 (cadena pesada) y la secuencia nucleotídica de la SEC ID N°: 15 (cadena ligera).
10. Un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 12 a 14 o una composición de anticuerpo anti-ROR1 farmacéuticamente aceptable que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de cáncer.
11. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde el cáncer es leucemia, linfoma o LLC.
12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo sirve como proteína vehículo para un fármaco.
13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde el fármaco se conjuga con el anticuerpo, proporcionando así un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC).
14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, donde el conjugado de anticuerpo-fármaco media la citotoxicidad.



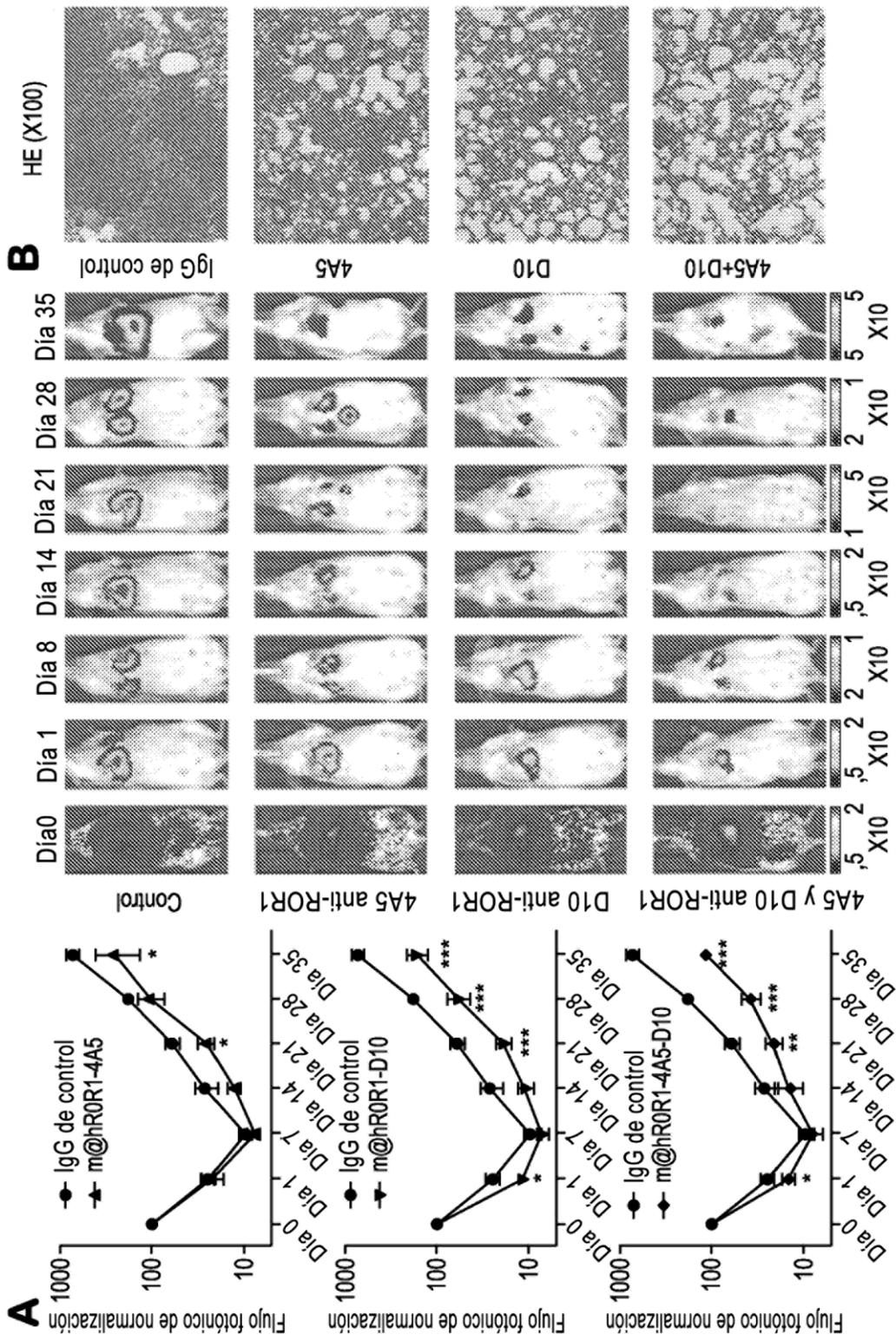
**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**

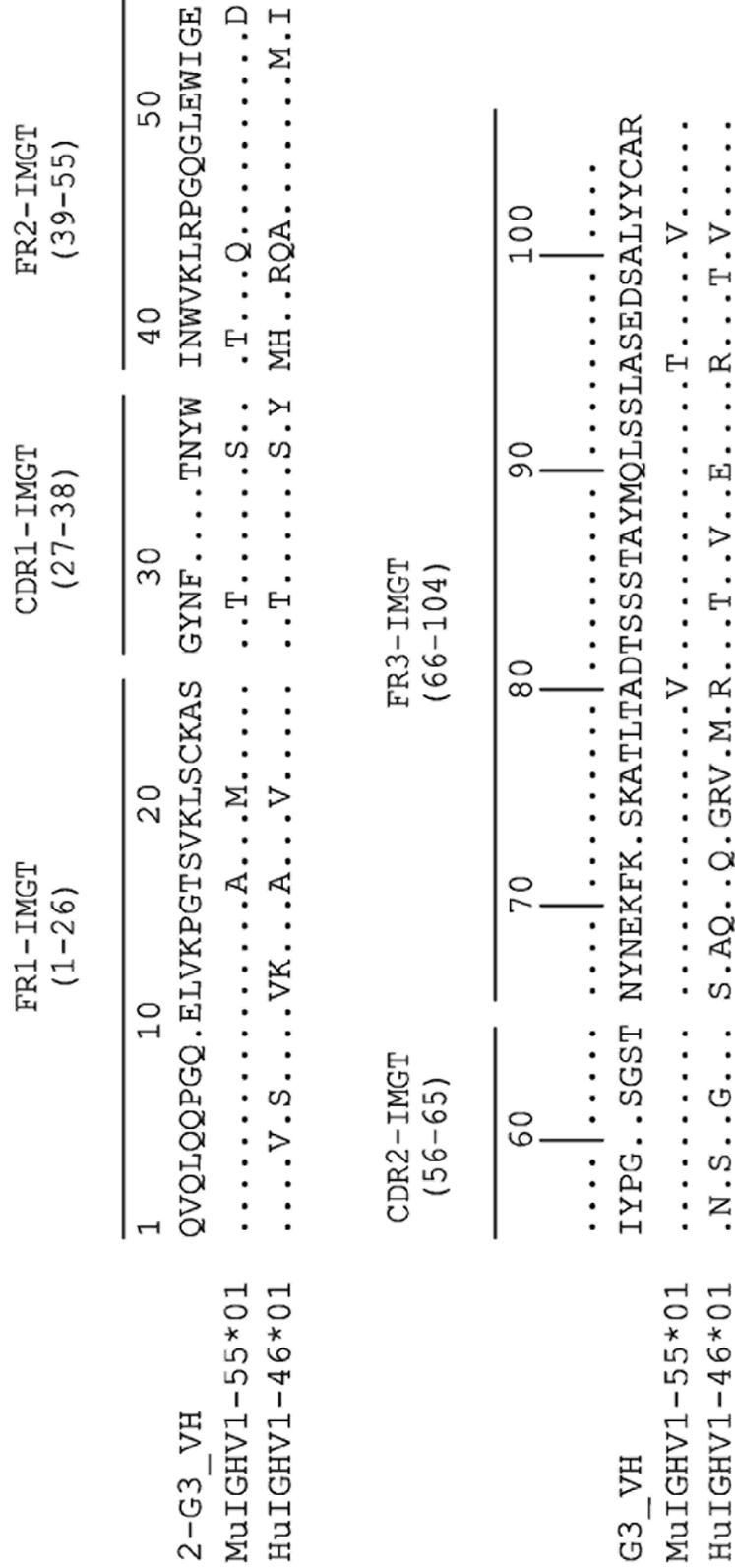
Comparación de la cadena pesada de Ig 4A5 con la IGHV de ratón y humana de línea germinal más cercana

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)
	10    20    30    40    50		
4A5_VH	EVKLVESGG.GLVKPGGSLKLSCAAS	GFTF...SSYA	MSWVRQIPEKRLEWVAS
MuIGHV5-09*02	.....	..A.....D	.....T.....T
HuIGHV3-48*01	..Q.....Q.....R.....	.....S	..N.....A.G.G.....SY
	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	
	60    70    80    90    100		
4A5_VH	ISRG...GTT	YYPDSVK.GRFTISRDNVRNIIYLQMSLRS	EDTAMYCGR
MuIGHV5-09*02	..S.....SY.	.....A..T.....	.....L....A.
HuIGHV3-48*01	..SS..SS.I	..A.....AK.S.....N.....A.....V....A.	

**FIG. 5**



Comparación de la cadena pesada de Ig 2-G3 con la IGHV de ratón y humana de línea germinal más cercana



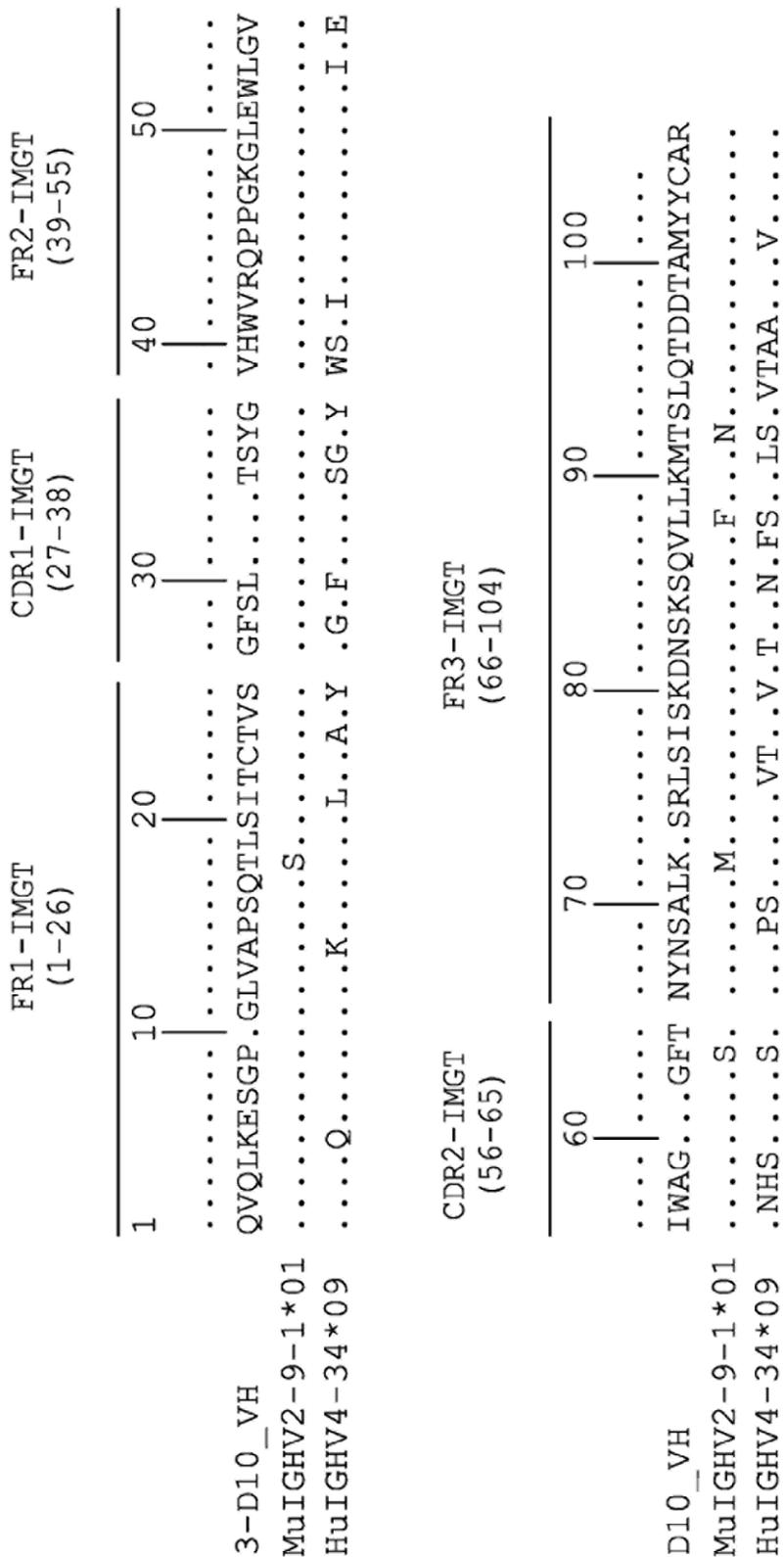
**FIG. 7**

Comparación de la cadena pesada de Ig 3-H10 con la IGHV de ratón y humana de línea germinal más cercana

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)
	1    10    20    30    40    50		
3-H10_VH	EVKLVESGG.GLVKPGGSLKLSCAAS	GFAF...TGYN	MNWKQTNGKSLEWIGS
MuIGHV5-9*02	.....	..A.....D	.....T
HuIGHV3-23*04	..Q.....Q.....R.....	.....	.....A.G.G.....SA
	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	
	60    70    80    90    100		
H10_VH	ISTG...AST YFPDSVK.GRFTISRDNARNILYLQMSLRS	EDTAMYYCAR	
MuIGHV5-9*02	..S...G... Y.....T.....L.....		
HuIGHV3-23*04	..GS..GG.. YA.....SK.T.....N...A...V...K		

**FIG. 8**

Comparación de la cadena pesada de Ig 3-D10 con la IGHV de ratón y humana de línea germinal más cercana



**FIG. 9**

Las proteínas ROR1 humana y de murino están altamente conservadas



Región	Posición	n° de aa diferentes
De tipo lg	1---147aa	12
Ligador entre de tipo lg y CRD	148---165aa	1
CRD	166---299aa	1
Ligador entre CRD y Kringle	300---312aa	0
Kringle	313---391aa	1
Ligador entre Kringle y TM	392---406aa	0

**FIG. 10**

Estructura de dominio y homología de secuencia de la proteína extracelular ROR1 de humano y de murino

hR0R1	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAQAQTELSVSAELVPTSSWNISSSELNPKDSYLLT <u>LDPEMNNITTS</u> <u>LGQTAELHCK</u>	80
mR0R1	.....P.....D.....T.....ID.G.....	
hR0R1	<u>VSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVL</u> <u>FVKFGPPPTASPGY</u>	160
mR0R1	.....S.....I...A.N.....K...T.....	
	Dominio de Ig	
hR0R1	<u>SDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRITVYMESLHQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSS</u>	240
mR0R1	.....	
hR0R1	<u>VPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMLMLRLKLPNCEDLPQEPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVD</u>	320
mR0R1	.....V.....	
	Kringle	
hR0R1	<u>YRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTILDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKN</u>	400
mR0R1	.....S.....	
hR0R1	KMEILY	
mR0R1	.....	

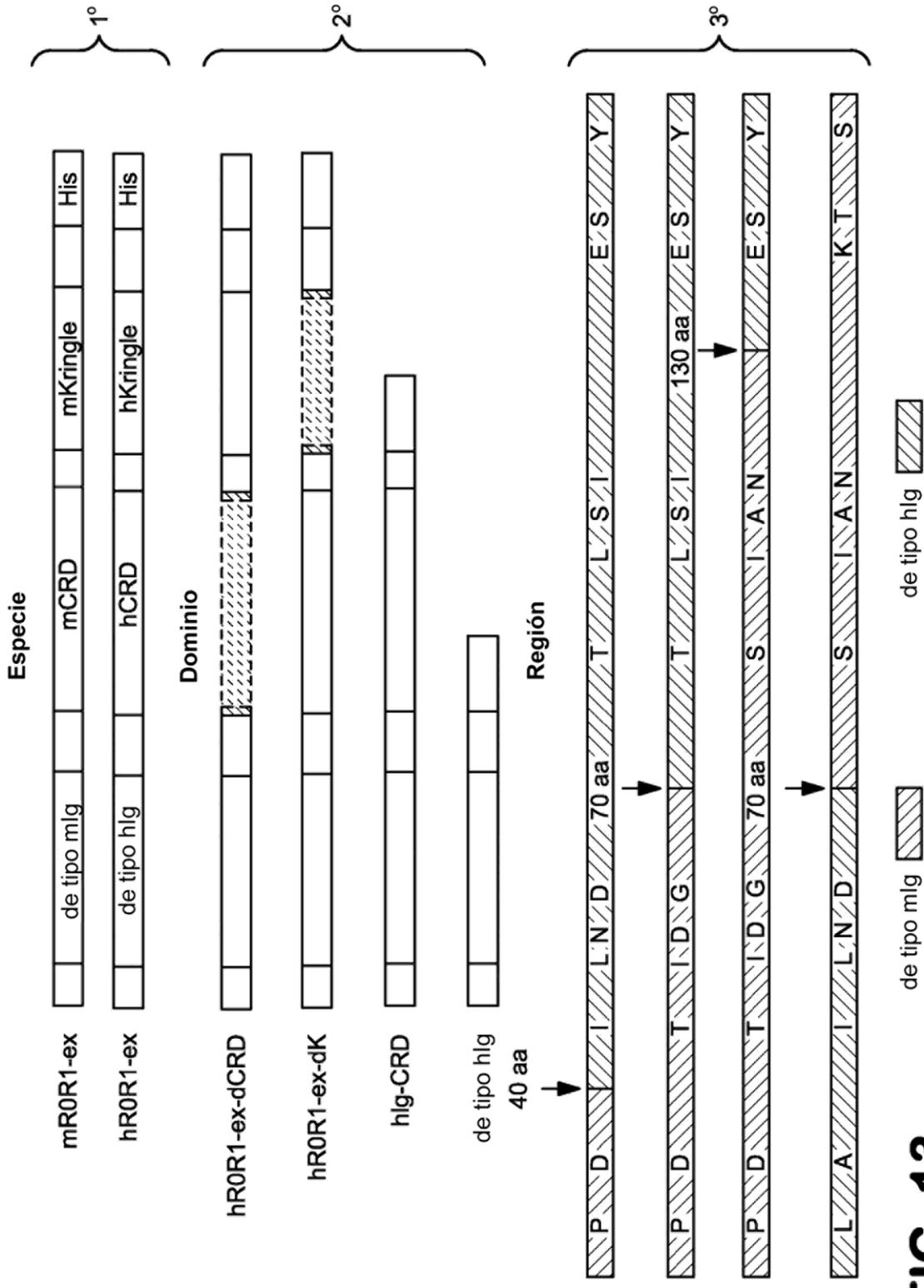
**FIG. 11**

AcM anti-ROR1 generados a través del dominio extracelular

Sitios de unión de anticuerpos					
Nº	5' de tipo Ig	En medio de tipo Ig	3' de tipo Ig	CRD	Kringle
1-4A5		✓			
G11		✓			
H11		✓			
2G3		✓			
3-D10			✓		

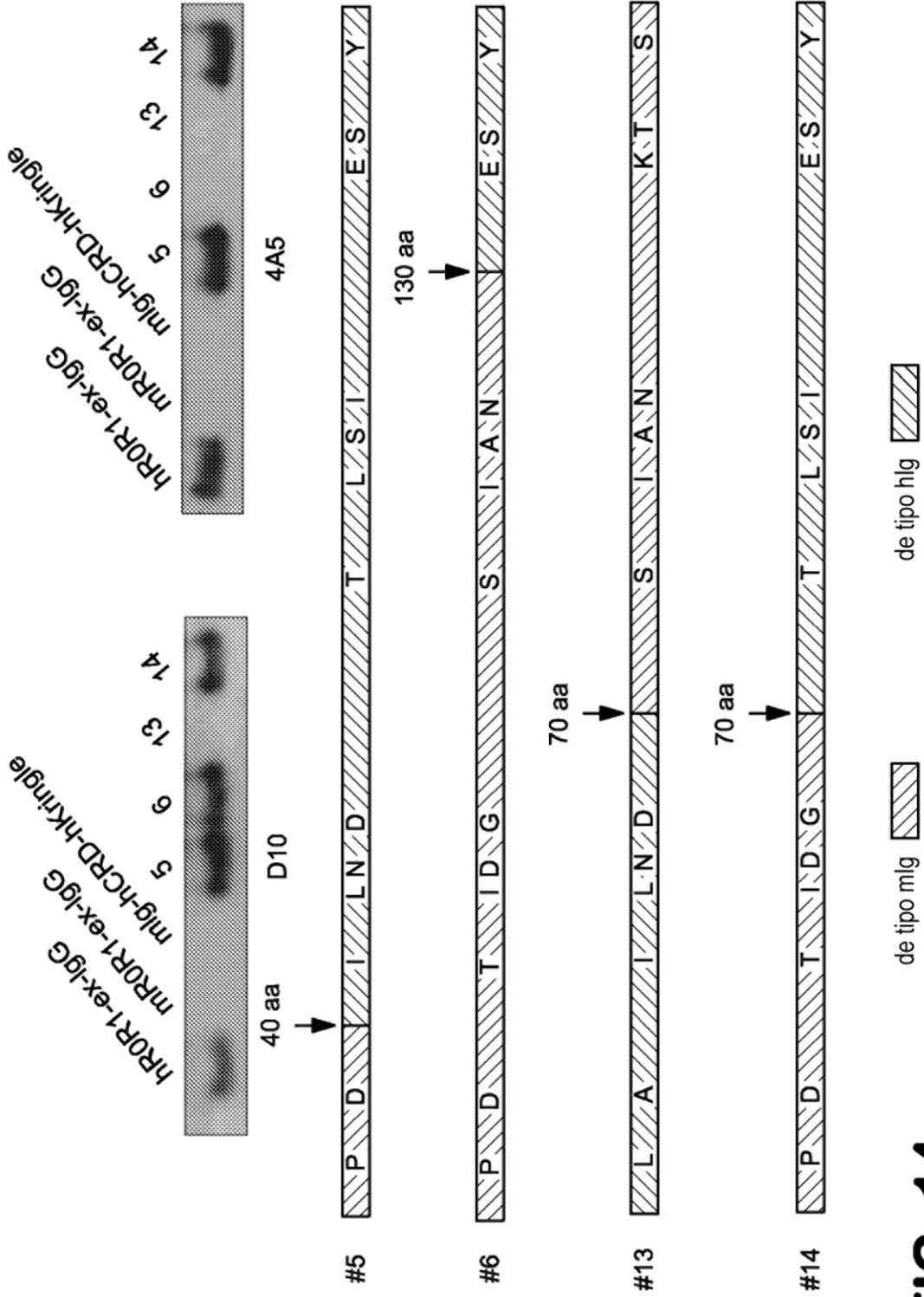
**FIG. 12**

Determinación del sitio de unión de AcM anti-ROR1



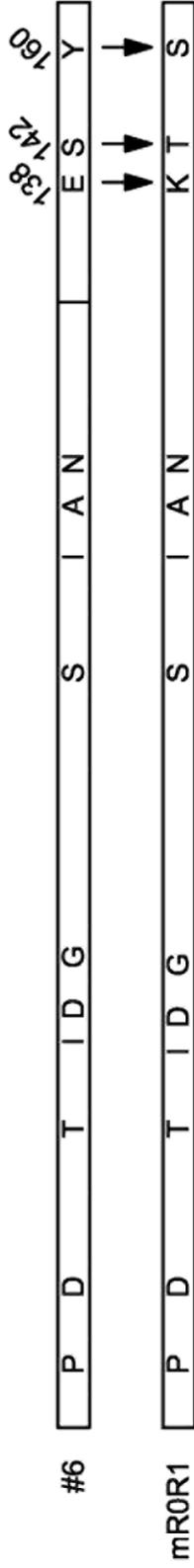
**FIG. 13**

Determinación de la región de unión de AcM anti-ROR1

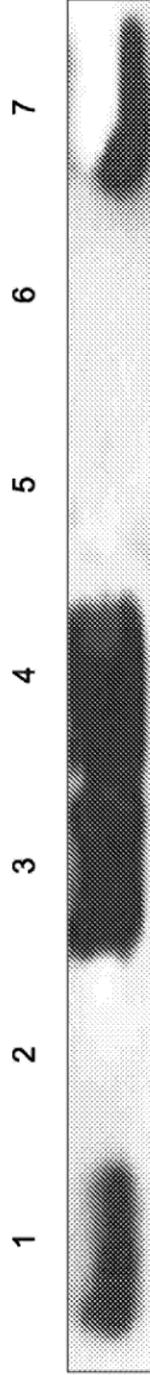


**FIG. 14**

3-D-10 se une al residuo de ácido glutámico humano



Los aminoácidos 138, 142 y 160 se mutaron individual y doblemente



1. proteína nº 6 (tipo silvestre)
2. 138 mutación
3. 142 mutación
4. 160 mutación
5. 138-142 mutación
6. 138-160 mutación
7. 142-160 mutación

**FIG. 15**

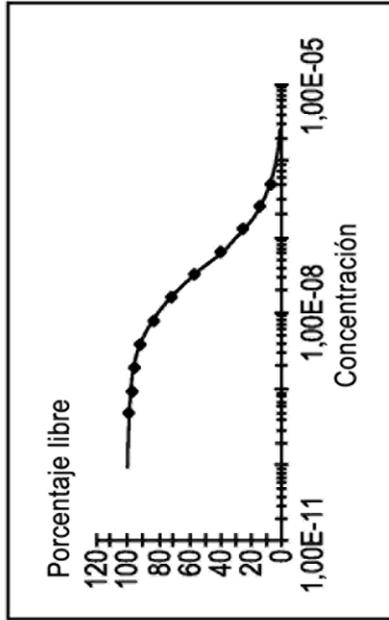
Determinación de Kd de 3-D10

Análisis (x)

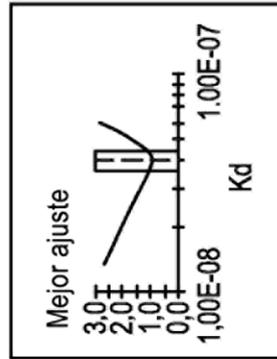
Valor basal / criterios de valoración:

5 a 10 (s) del inicio  
10 a 5 (s) del final

Unión	Señal	Concentración	Kd	ABC
0,0499	500nM		= 40,47nM	= 40,47pM
0,0805	250nM		Relación = 0,0010	
0,1525	125nM		100 % de señal = 0,54	
0,2084	62,5nM		Deriva = 0,7514	
0,2405	31,25nM		NSB = 0,00	
0,4173	15,63nM		Deriva = -0,7086	
0,4760	7,81nM		%Error = 0,92	
0,5175	3,90nM			
0,5015	1,95nM			
0,5390	976,56pM			
0,5496	488,28pM			
0,5581	0			
0,0012	0			
0,0082	500nM			
0,0777	250nM			
0,1245	125nM			
0,1684	62,5nM			
0,2908	31,25nM			
0,3642	15,63nM			
0,4170	7,81nM			
04595	3,90nM			
0,4782	1,95nM			
0,4804	976,56pM			
0,4870	488,28pM			
0,4968	0			
0,0049	0			



Kd = 40,47nM  
Intervalo de confianza del 95 %  
Kd alta = 43,50nM  
Kd baja = 26,25nM



ABC = 40,47pM  
Intervalo de confianza del 95 %  
ABC alta = 0,70nM  
ABC baja = Menor de 146,19nM

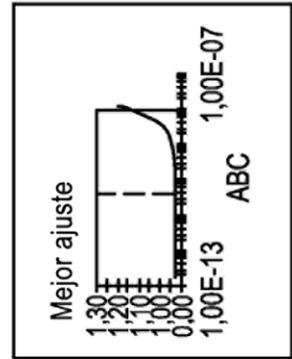


FIG. 16A

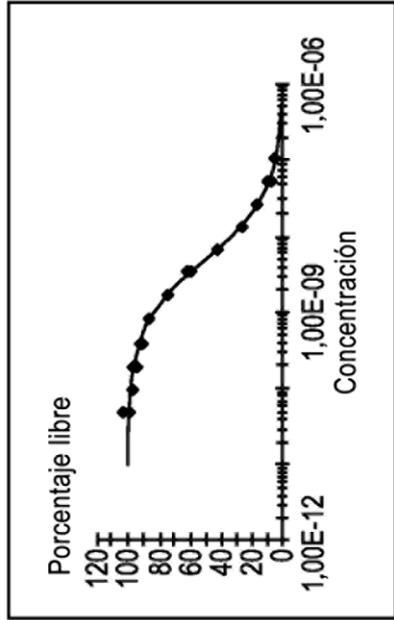
Determinación de Kd de 1-4A5

Análisis (x)

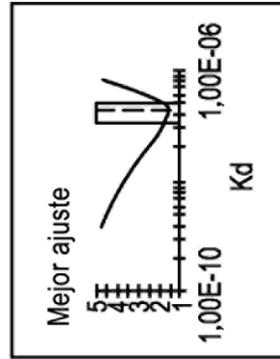
Valor basal / criterios de valoración:

0 a 10 (s) del inicio  
10 a 5 (s) del final

Ignorar Señal	Unión Señal	Concentración	Kd
			ABC = 4,53nM
			Relación = 0,0139
			100 % de señal = 0,40
			Deriva = -0,0110
			(%/tanda)
			NSB = 0,04
			Deriva = -2,0021
			(mV/tanda)
			%Error = 1,53
		100nM	
		50nM	
		25nM	
		12,5nM	
		6,25nM	
		3,13nM	
		1,56nM	
		781,25pM	
		390,63pM	
		195,31pM	
		97,66pM	
		48,83pM	
		0	
		100nM	
		50nM	
		25nM	
		12,5nM	
		6,25nM	
		3,13nM	
		1,56nM	
		781,25pM	
		390,63pM	
		195,31pM	
		97,66pM	
		48,83pM	
		0	



Kd = 4,53nM  
Intervalo de confianza del 95 %  
Kd alta = 5,09nM  
Kd baja = 3,33nM



ABC = 62,92pM  
Intervalo de confianza del 95 %  
ABC alta = 2,59nM  
ABC baja = Menor de 227,30fM

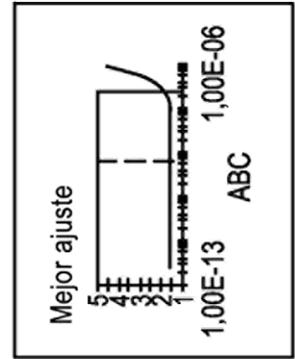
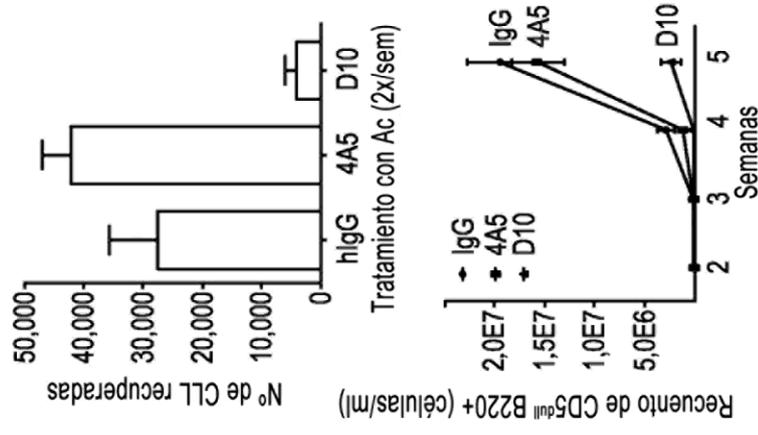


FIG. 16B

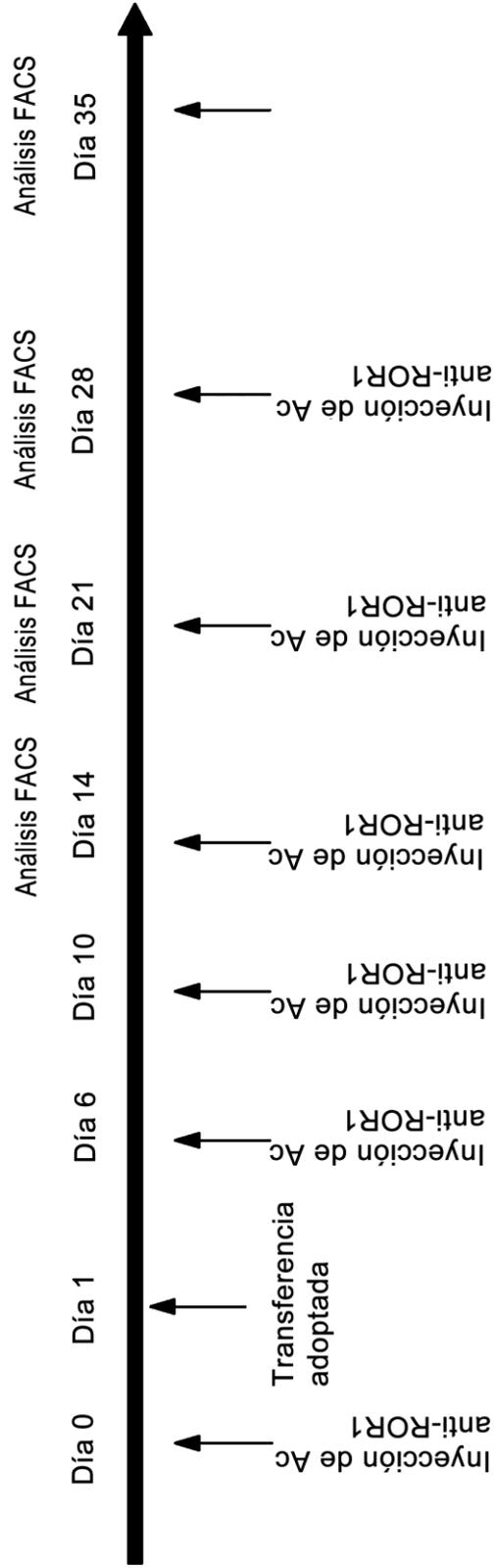
El AcM anti-ROR1 3-D10 es altamente activo en ensayos *in vivo*

- AcM 3-D10 altamente activo en el modelo de actividad dependiente de nicho *in vivo*
  - Reducción sustancial de la carga leucémica usando 4 productos de pacientes de CLL primarios probados en 76 ratones
  - Actividad mucho mayor que otros AcM anti-ROR1 (4A5)
- AcM 3D-10 activo en el modelo de ratón inmunocompetente *in vivo*
  - Reducción sustancial en el modelo de leucemia que expresa ROR1 humana espontáneamente
  - Actividad mucho mayor que otros AcM anti-ROR1 (4A5)

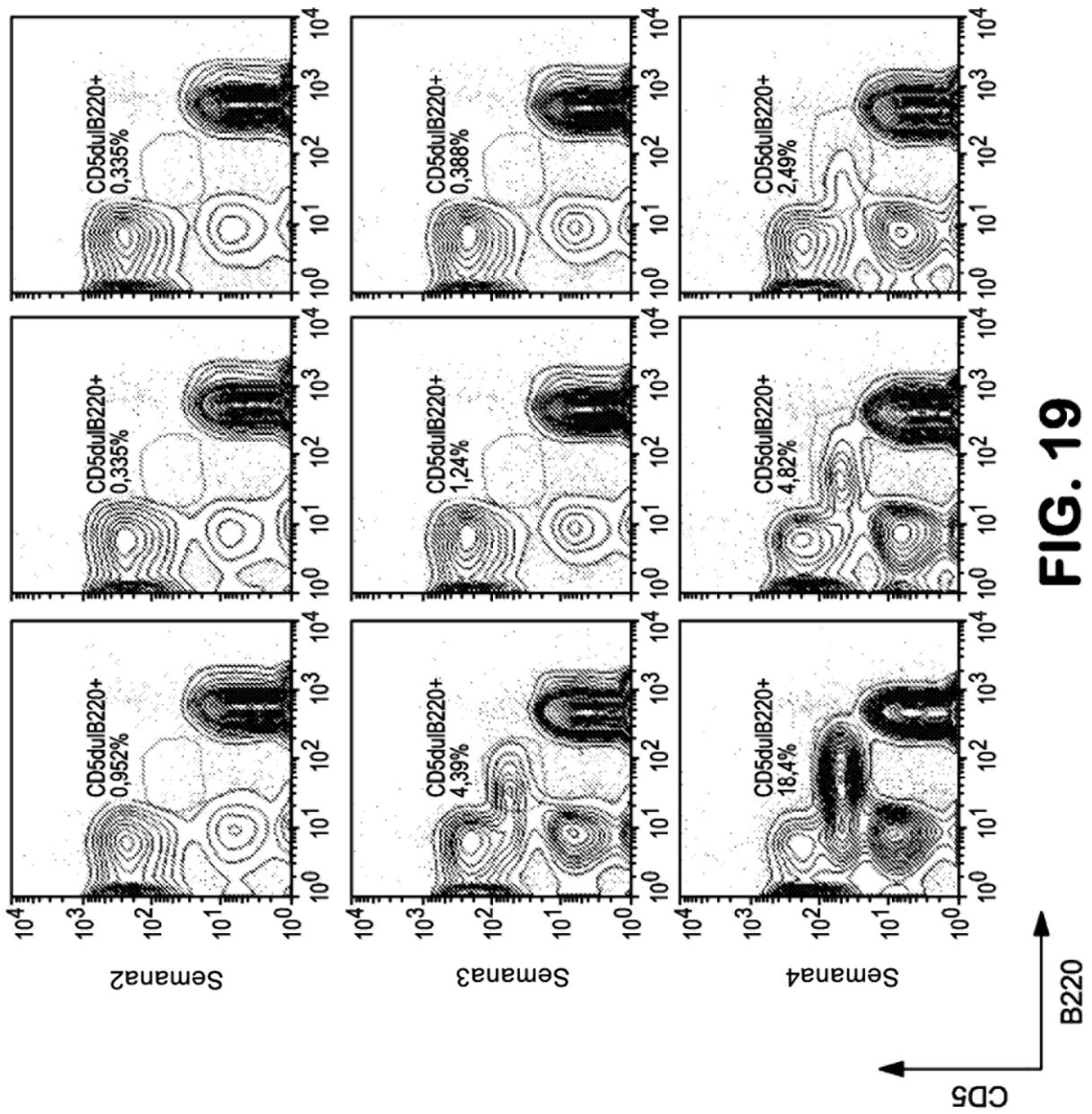


El AcM 3-D10 tiene la máxima actividad anti-ROR1 en sistemas de ensayo *in vivo*

**FIG. 17**

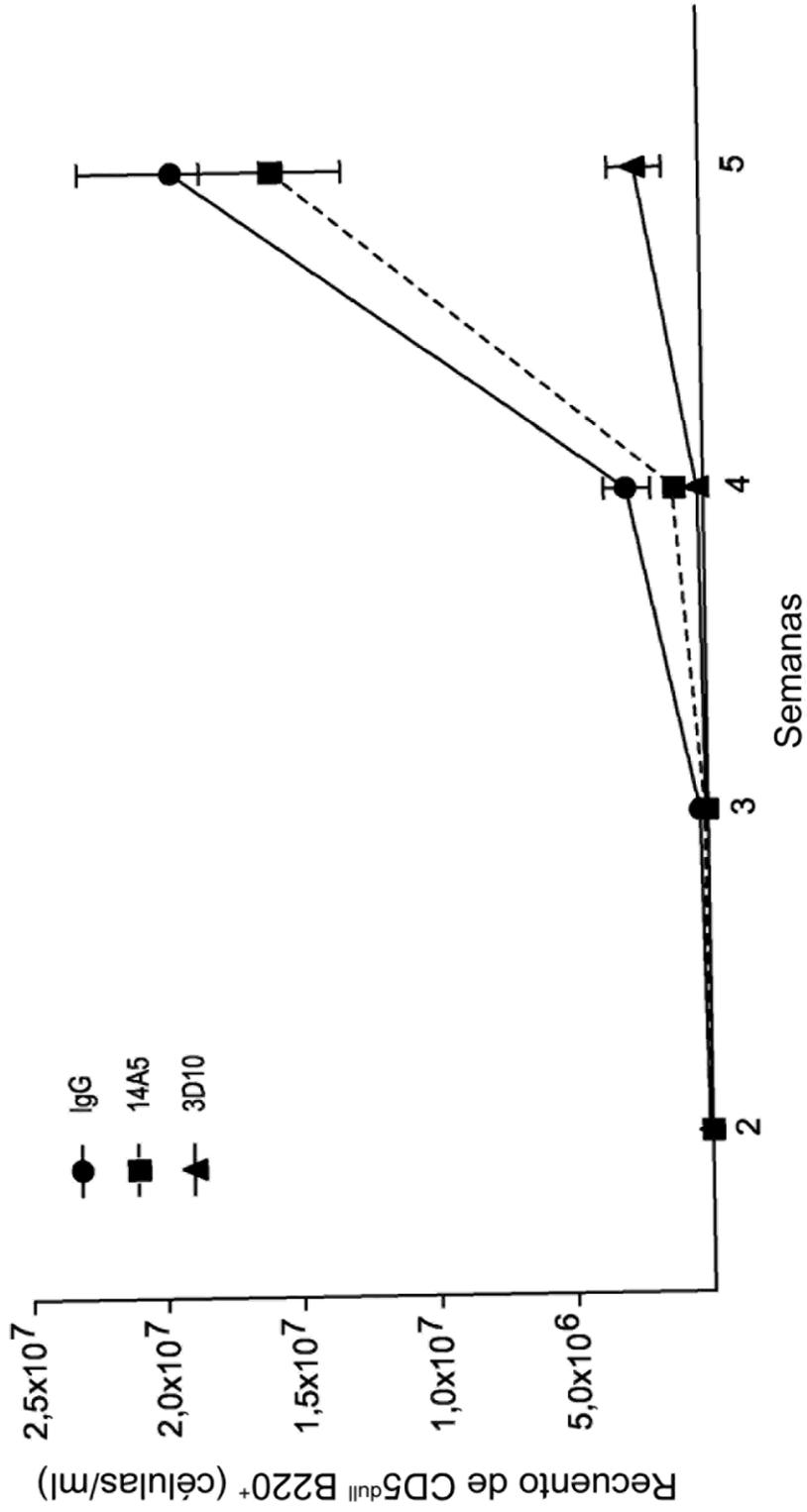


**FIG. 18**



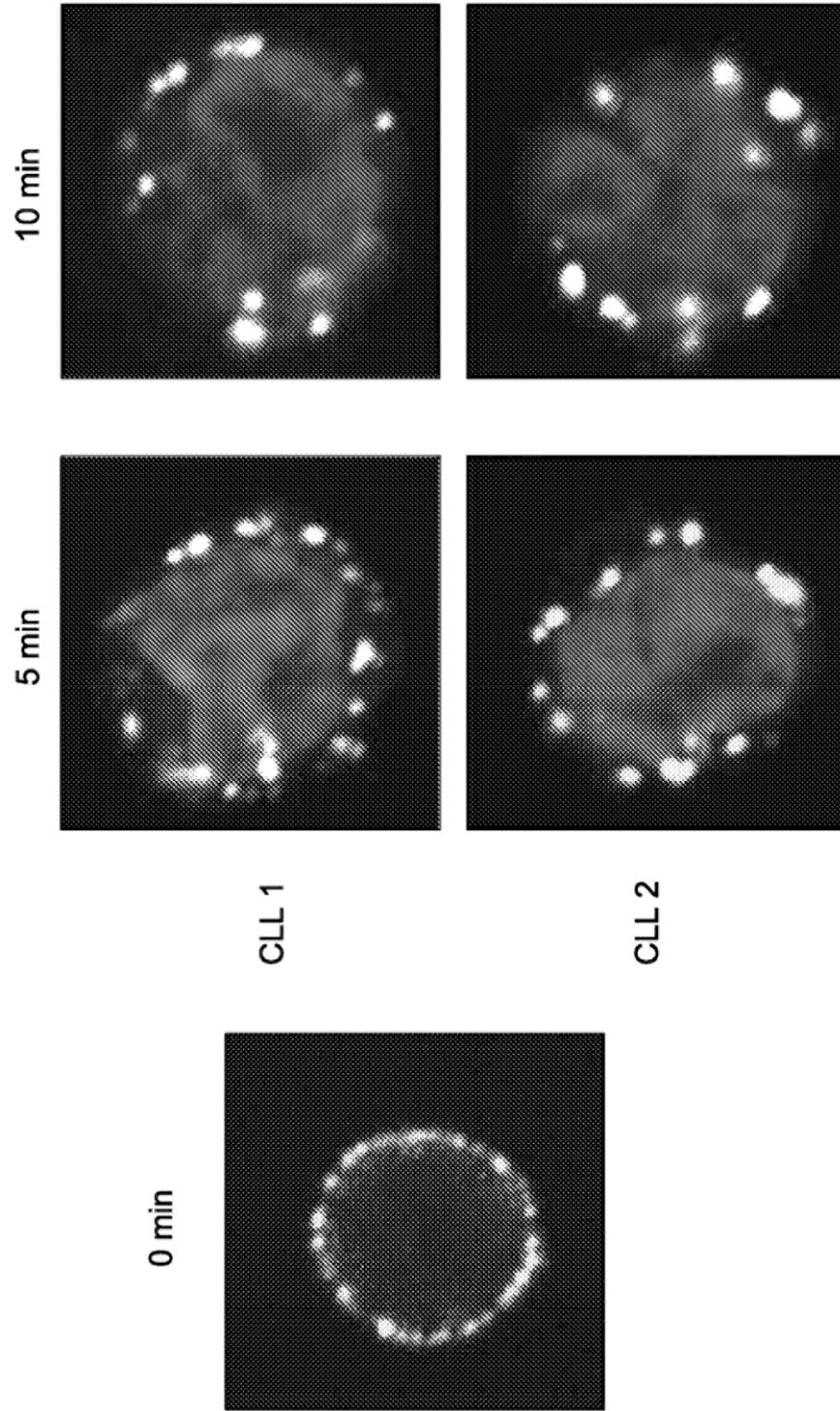
**FIG. 19**

Desarrollo de leucemia de CD5<sup>dull</sup> B220<sup>+</sup>  
(recuento absoluto de células de leucemia)



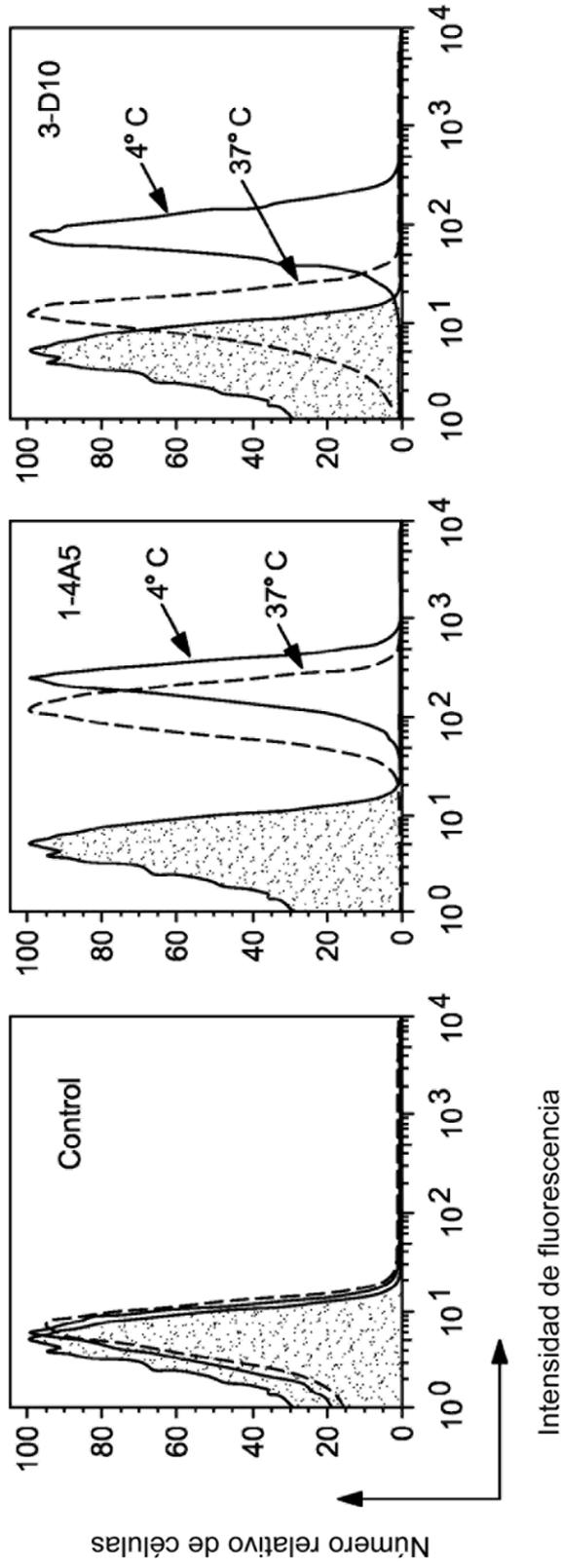
**FIG. 20**

Internalización rápida de Ac 3D-10 anti-ROR1 en células CLL



**FIG. 21**

Estudio de internalización de anticuerpo anti-hROR1



**FIG. 22**

Estudios de internalización de 1-4A5 y 3D-10 y cinética de la internalización de anticuerpo de ROR1

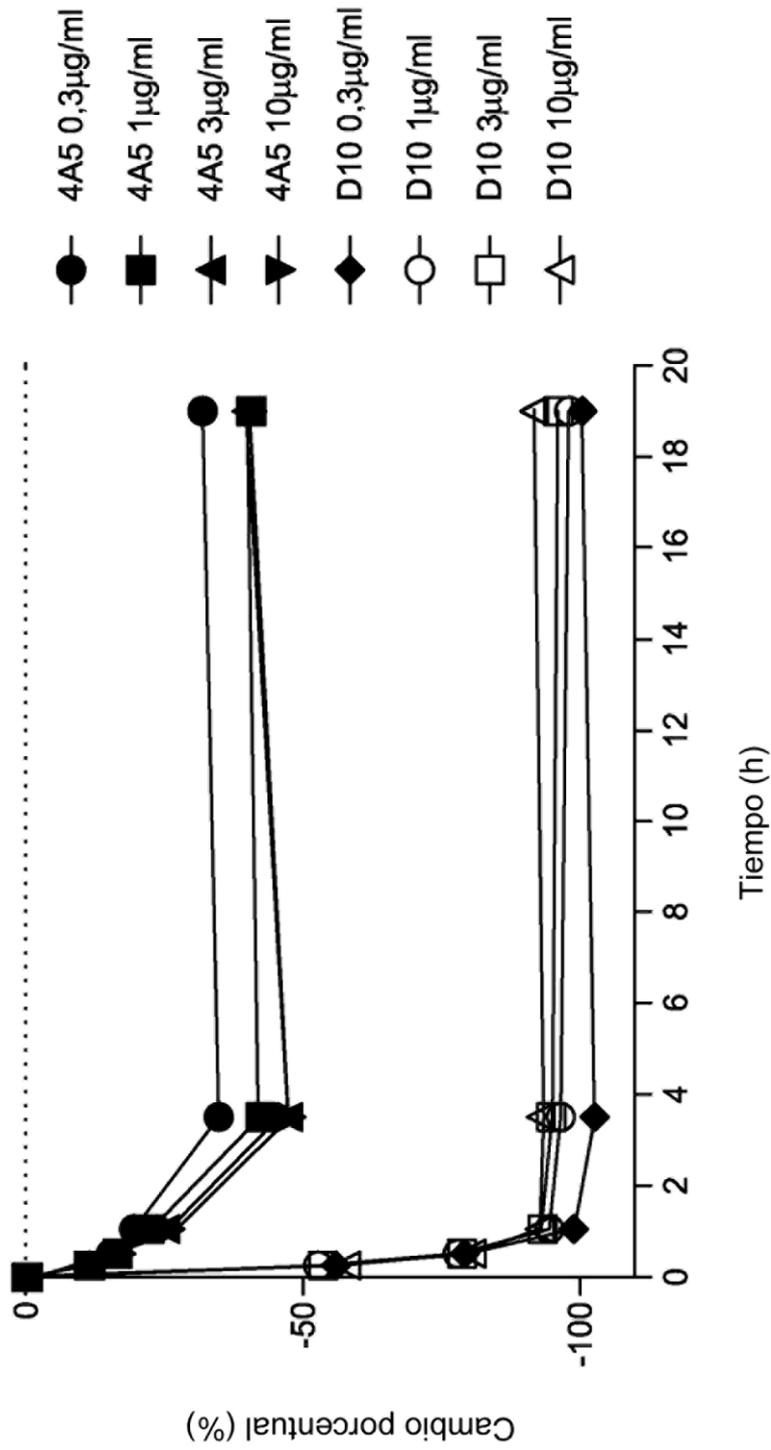
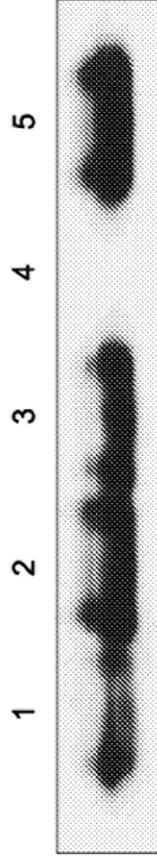


FIG. 23

Sitio de unión de 4A5



Los aminoácidos 88, 105, 109 y 111 se mutaron individualmente.



1. 88aa mutación
2. 105aa mutación
3. 109aa mutación
4. 111aa mutación
5. proteína nº 14 (tipo silvestre)

4A5 se une al aminoácido 111 de ROR1 humana

**FIG. 24**