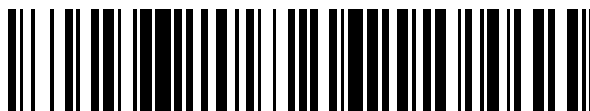


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 316**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2010 PCT/EP2010/007524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011 WO11079902**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10798728 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2513146**

54 Título: **Anticuerpos contra ROR1 que pueden inducir muerte celular de LLC**

30 Prioridad:

**03.06.2010 GB 201009307**  
**18.12.2009 GB 0922143**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.10.2017**

73 Titular/es:

**KANCERA AB (100.0%)**  
**Karolinska Science Park, Banvaktsvägen 22**  
**171 48 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**MELLSTEDT, HÅKAN;**  
**RABBANI, HODJATTALLAH y**  
**TEIGE, INGRID**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 635 316 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 contra ROR1 que pueden inducir muerte celular de LLC

5 La presente invención se refiere a moléculas biológicas que inhiben ROR1. En particular se proporcionan anticuerpos inhibidores que pueden inducir muerte celular mediante la unión específica de ROR1, dominios de los mismos o moléculas de nucleótido que codifican para ROR1. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 El trabajo que condujo a esta invención ha recibido financiación del Séptimo Programa Marco de la Comunidad Europea FP7/2007-2013/ con la subvención n.º HEALTH-F5-2008-200755.

15 La leucemia linfocítica crónica (LLC) es un cáncer de glóbulos blancos que se caracteriza por una proliferación neoplásica anómala de células de linfocitos B (células B). Las células B de LLC difieren de las células B normales en su estadio de activación y maduración y se derivan en particular de células B expuestas a antígeno con diferentes mutaciones de genes de cadena pesada variable de inmunoglobulina (*IgVH*) (Chiorazzi N *et al.*, N Engl J Med 2005; 352:804-15). Los pacientes con LLC con genes *IgVH* mutados tienen un mejor pronóstico en comparación con pacientes con genes no mutados (Damle RN *et al.*, Blood 1999; 94:1840-7; Hamblin TJ *et al.*, Blood 1999; 94:1848-54).

20 Los estudios de obtención del perfil de expresión génica global han revelado perfiles de expresión parcialmente distintos pero en general solapantes en células B leucémicas mutadas y no mutadas, sugiriendo un fenotipo común (Klein U *et al.*, J Exp Med 2001; 194:1625-38; Rosenwald A *et al.*, J Exp Med 2001;194:1639-47).

25 Los estudios de obtención del perfil de expresión génica han mostrado un aumento de 43,8 veces de la tirosina cinasa receptora huérfana (RTK) *ROR1* en células de LLC (Klein U *et al.*, J Exp Med 2001; 194:1625-38). *Ror1* es un miembro de la familia RTK de receptores huérfanos relacionados con cinasa específica de músculo (MUSK) y receptores de neurotrofina Trk (Glass DJ, *et al.*, Cell 1996; 85:513-23; Masiakowski P *et al.*, J Biol Chem 1992; 267:26181-90; Valenzuela DM *et al.*, Neuron 1995; 15:573-84).

30 Los receptores *Ror* son receptores de la superficie celular que participan en la transducción de señales, interacción célula-célula, regulación de la proliferación celular, diferenciación, metabolismo y supervivencia celulares (Masiakowski P *et al.*, Biol Chem 1992; 267:26181-90; Yoda A *et al.*, J Recept Signal Transduct Res 2003; 23:1-15). Están altamente conservados evolutivamente entre diferentes especies, por ejemplo humano, ratón, *Drosophila* y *C. elegans*.

35 El gen *ROR1* humano tiene una región codificante de 2814 pb con una secuencia de 937 aminoácidos predicha y un tamaño de proteína de 105 kDa incluyendo un dominio de tipo Ig, dominio rico en cisteína, dominio Kringle, dominio tirosina cinasa y dominio rico en prolina (figura 1) (Yoda A *et al.*, J Recept Signal Transduct Res 2003; 23:1-15).

40 *ROR1* está ubicado en la región cromosómica 1 p31.3 (<http://www.ensembl.org>), una región en la que no se observan frecuentemente aberraciones cromosómicas en tumores malignos hematológicos (figura 2). El *ROR1* humano se expresa en corazón, pulmón y riñón pero menos en placenta, páncreas y músculos esqueléticos (Reddy UR *et al.*, Oncogene 1996; 13:1555-9). *ROR1* se clonó originalmente a partir de una línea celular de neuroblastoma (Masiakowski P *et al.*, J Biol Chem 1992; 267:26181-90) y posteriormente se aisló una forma más corta que carecía del dominio extracelular completo pero contenía el dominio transmembrana a partir de una biblioteca de cerebro fetal. Se ha notificado el gen de *Ror1* truncado (t-*Ror1*) en el sistema nervioso central de humano adulto y fetal, en leucemias humanas, líneas celulares de linfoma, y en una variedad de cánceres humanos derivados del neuroectodermo (Reddy UR *et al.*, Oncogene 1996; 13:1555-9). Un transcrito más corto a partir de los exones 1-7 que incluye una parte corta del intrón 7 también se ha descrito con una longitud predicha de 393 aminoácidos y un peso molecular de 44 kDa (ID de Ensembl; ENSG00000185483).

45 En un primer aspecto se proporciona un inhibidor biológico de ROR1. El documento WO2008/076868 A1 da a conocer anticuerpos policlonales contra ROR1 que conducen a apoptosis de células tumorales.

50 Los inhibidores biológicos pueden adoptar muchas formas e incluyen diferentes modos de acción. Por inhibición biológica quiere decirse que la cantidad de o acción de ROR1 se reduce, y puede provocarse por la exposición a un inhibidor biológico. Por ejemplo, el inhibidor puede actuar directamente mediante unión a ROR1 o una secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1. El inhibidor puede actuar alternativamente impidiendo la interacción de ROR1 con moléculas con las que normalmente interacciona, por ejemplo mediante el bloqueo de receptores, el secuestro de moléculas que se unen a o se asocian con ROR1, impidiendo la inserción de ROR1 o que sus parejas de unión se inserten en una membrana, tal como la membrana celular.

55 Preferiblemente, el inhibidor biológico se une específicamente a o bien un dominio extracelular de ROR1, un dominio intracelular de ROR1 o bien a una secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1.

El inhibidor biológico es convenientemente uno de un anticuerpo, una molécula de ácido nucleico de interferencia o un receptor soluble.

5 En una realización el inhibidor biológico es un anticuerpo. Por anticuerpo quiere decirse anticuerpos completos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Tales fragmentos se definen a continuación.

10 Los anticuerpos comprenden dos polipéptidos idénticos de  $M_r$  50.000-70.000 (denominados "cadenas pesadas") que se unen entre sí mediante un enlace disulfuro, cada una de las cuales se une a una pareja idéntica de polipéptidos de  $M_r$  25.000 (denominados "cadenas ligeras"). Hay una variabilidad de secuencia considerable entre extremos N-terminales individuales de cadenas pesadas de diferentes moléculas de anticuerpo y entre cadenas ligeras individuales de diferentes moléculas de anticuerpo y estas regiones se han denominado por tanto "dominios variables". A la inversa, hay una similitud de secuencia considerable entre extremos C-terminales individuales de cadenas pesadas de diferentes moléculas de anticuerpo y entre cadenas ligeras individuales de diferentes moléculas de anticuerpo y estas regiones se han denominado por tanto "dominios constantes".

15 El sitio de unión a antígeno está formado por regiones hipervariables en los dominios variables de un par de cadenas pesada y ligera. Las regiones hipervariables también se conocen como regiones determinantes de complementariedad (CDR) y determinan la especificidad del anticuerpo por un ligando. Los dominios variables de la cadena pesada ( $V_H$ ) y cadena ligera ( $V_L$ ) comprenden normalmente tres CDR, cada una de las cuales está flanqueada por una secuencia con menos variación, que se conocen como regiones de entramado (FR).

20 Los dominios pesado variable ( $V_H$ ) y ligero variable ( $V_L$ ) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento del antígeno, un hecho reconocido en primer lugar mediante experimentos de digestión con proteasas temprana. Se encontró confirmación adicional mediante la "humanización" de anticuerpos de roedor. Pueden fusionarse dominios variables de roedor con dominios constantes de origen humano de manera que el anticuerpo resultante conserva la especificidad de antígeno del anticuerpo de roedor original (Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81, 6851-6855).

30 Que la especificidad de antígeno la confieren dominios variables y es independiente de los dominios constantes se sabe de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpo, que contienen todos uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas de tipo Fab (Better *et al.*, 1988, Science, 240:1041). Las moléculas de Fv (Skerra *et al.*, 1988, Science, 240, 1038); moléculas de Fv de cadena sencilla (ScFv) en las que los dominios de pareja de  $V_H$  y  $V_L$  están unidos por medio de un oligopéptido flexible (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85:5879) y anticuerpos de un único dominio (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward *et al.*, 1989 Nature 341, 544). Se encontrará una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpo que conservan sus sitios de unión específica en Winter *et al.*, 1991, Nature, 349, 293-299.

40 Para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse diversos animales huésped adecuados (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) mediante una o más inyecciones con la proteína nativa, una variante sintética de la misma, o un derivado de la anterior. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, la proteína inmunogénica que se produce de manera natural, un polipéptido sintetizado químicamente que representa la proteína inmunogénica o una proteína inmunogénica expresada de manera recombinante. Además, la proteína puede conjugarse con una segunda proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que está inmunizándose. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen pero no se limitan a hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. La preparación puede incluir además un adyuvante. Diversos adyuvantes usados para aumentar la respuesta inmunológica incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, dinitrofenol, etc.), adyuvantes que pueden usarse en humanos tales como bacilo Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*, o agentes inmunoestimuladores similares. Los ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante de MPL-TDM (monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético).

55 Las moléculas de anticuerpo policlonal dirigidas contra la proteína inmunogénica pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporciona principalmente la fracción de IgG de suero inmunitario. Posteriormente, o alternativamente, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo de la misma, puede immortalizarse en una columna para purificar el anticuerpo específico inmunitario mediante cromatografía de inmunoafinidad. La purificación de inmunoglobulinas se comenta, por ejemplo, en D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia Pa., vol. 14, n.º 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

65 La expresión "anticuerpo monoclonal" (AcM) o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene sólo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto génico de cadena ligera única y un producto génico de cadena pesada única. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del

anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los AcM contienen por tanto un sitio de unión a antígeno que puede inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por el mismo.

5 El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o humanizado o un fragmento del mismo.

El anticuerpo puede ser un fragmento incluyendo moléculas de scFv o moléculas de Fab.

10 Por "moléculas de ScFv" quiere decirse moléculas en las que los dominios de pareja  $V_H$  y  $V_L$  se unen mediante un oligopéptido flexible.

15 Las ventajas de usar fragmentos de anticuerpo que tienen actividad de unión a antígeno, en vez de anticuerpos completos, son múltiples. El menor tamaño de los fragmentos puede conducir a propiedades farmacológicas mejoradas, tales como mejor penetración de tejido sólido. Las funciones efectoras de anticuerpos completos, tales como unión al complemento, se eliminan. Los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb de anticuerpo pueden expresarse todos en y se secretan de *Escherichia coli* (*E. coli*), permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

20 Los anticuerpos completos, y fragmentos  $F(ab')_2$  son "bivalentes". Por "bivalente" se entiende que dichos anticuerpos y fragmentos  $F(ab')_2$  tienen dos sitios de combinación de antígeno. Por lo contrario, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes, teniendo solo un sitio de combinación de antígeno.

25 Los métodos para generar, aislar y usar anticuerpos para un antígeno o epítipo deseado los conocen bien los expertos en la técnica relevante. Por ejemplo, puede generarse un anticuerpo en un animal huésped adecuado (tal como, por ejemplo, un ratón, conejo o cabra) usando métodos convencionales conocidos en la técnica y o bien se usan como antiseros en bruto o purificados, por ejemplo mediante purificación de afinidad. Un anticuerpo de especificidad deseada puede generarse alternativamente usando métodos de biología molecular bien conocidos, incluyendo selección de una biblioteca molecular de anticuerpos recombinantes, o injerto o intercambio de regiones determinantes de complementariedad (CDR) en regiones de entramado apropiadas. Los anticuerpos humanos pueden seleccionarse de bibliotecas recombinantes y/o generarse injertando CDR de anticuerpos no humanos sobre regiones de entramado humanas usando técnicas de biología molecular bien conocidas.

30 Los anticuerpos de una realización de la invención pueden presentar las secuencias mostradas en las figuras 17, 18 y 19.

35 Por dominio extracelular quiere decirse la parte de una molécula biológica que se extiende más allá de la superficie de membrana de la célula, en la que dicha molécula biológica está integrada en/incrustada en la membrana celular. Un ejemplo de una molécula biológica de este tipo es un receptor que presenta una porción extracelular a la que se unen ligandos. Si la cadena polipeptídica del receptor atraviesa la bicapa varias veces, el dominio externo puede comprender varios "bucles" que sobresalen de la membrana. Uno cualquiera o una combinación de los cuales pueden formar un sitio de unión para un ligando.

40 Preferiblemente, el dominio extracelular al que se une el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

45 **WNISSELNKDSYLTL.**  
**RSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQ**

**YMESLHMQGEIENQI**  
**CQPWNSQYPHTHTFTALRFP**

50 Alternativamente el dominio intracelular al que se une el anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos NKSQKPYKIDSKQAS.

De manera conveniente el anticuerpo induce muerte celular en una célula que expresa ROR1 tras una unión específica del anticuerpo a una molécula de ROR1 o dominio de la misma.

55 Preferiblemente el inhibidor biológico provoca la muerte de una célula que expresa ROR1. Por muerte celular se entiende que se incluyen todas las formas de muerte celular, incluyendo apoptosis, necrosis y muerte celular autofágica.

La apoptosis (muerte celular programada, tipo I), es el proceso por el que las células se destruyen a sí mismas deliberadamente deshaciendo sistemáticamente su contenido que se absorbe entonces por células circundantes.

60

La muerte celular autofágica (también conocida como muerte celular programada o citoplásmica, tipo II) se caracteriza por la formación de grandes vacuolas que ingieren orgánulos en una secuencia específica antes de que se destruya el núcleo.

5 La necrosis es una muerte celular prematura que se produce sin deshacer sistemáticamente de manera controlada la célula y sus partes constituyentes. Normalmente, la necrosis se caracteriza por la ruptura de orgánulos y fuga de compuestos enzimáticos tales como lisozimas que entonces son dañinos y provocan la necrosis de células circundantes.

10 Los anticuerpos pueden usarse en terapia, por ejemplo, puede introducirse un medicamento que comprende anticuerpos terapéuticos en un sujeto para modular la respuesta inmunitaria de ese sujeto. Por ejemplo, un anticuerpo terapéutico específico para un antígeno en el sujeto estimulará una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno, induciendo y/o promoviendo de ese modo una respuesta inmunitaria y ayudando a la recuperación. Se conocen bien en la técnica métodos para administrar anticuerpos terapéuticos a un paciente que lo necesita.

15 En una realización alternativa el inhibidor biológico puede ser una molécula de ácido nucleico de interferencia incluyendo ARNip, ARN antisentido y ARNbc.

20 Preferiblemente la molécula de ácido nucleico de interferencia es un polinucleótido antisentido que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1 o fragmentos o variantes de la misma.

La hibridación puede producirse en cualquier condición de rigurosidad apropiada, por ejemplo 2xSSC a 65°C.

25 Por "polinucleótido" se entiende que se incluyen moléculas de ADN monocatenario y/o bicatenario (ácido desoxirribonucleico) y/o ARN (ácido ribonucleico) y derivados de las mismas. Por "polinucleótido codificante" se incluye un polinucleótido cuya secuencia puede traducirse para formar un polipéptido deseado.

30 También se ha encontrado ahora que la inhibición de angiogénesis puede inducirse usando ARNip (moléculas de ARN de interferencia pequeñas).

35 La interferencia por ARN (iARN) es un mecanismo natural para silenciar genes específicos. Los genes proporcionan a las células las instrucciones para producir proteínas, y cuando se silencia un gen, la célula deja de producir la proteína especificada por ese gen. La interferencia por ARN se observó por primera vez en plantas, pero el primer avance crucial en el entendimiento del mecanismo de iARN venía de estudios de gusanos. Esto fue en 1998 con el reconocimiento de que el ARN bicatenario (ARNbc) desempeñaba un papel central en iARN. La primera prueba para un silenciamiento *in vivo* de genes usando ARNip se publicó en 2002 (McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J. y Kay, M. A. (2002) RNA interference in adult mice. *Nature* (Londres) 418, 38-39) seguido por la publicación de Song *et al.* que mostraron que puede usarse ARNip para una intervención terapéutica. Este estudio mostró que la interferencia por ARN que selecciona como diana Fas protegió a ratones de una hepatitis fulminante. (Song, E., Lee, S. K., Wang, J. *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9, 347-351).

40 Las moléculas de ARNip pueden ser monocatenarias (ss) o bicatenarias (ds). Las moléculas de ARNip pueden administrarse usando un constructo, que puede expresar la molécula de ARNip tras la administración a la célula diana.

45 Un "ARN de interferencia pequeño" o "ARN de interferencia corto" o "ARNip" o "ARN en horquilla corto" o "ARNhp" es una molécula de ARN bicatenario que es complementario a una secuencia de ácido nucleico diana. Una molécula de ARN bicatenario se forma por el apareamiento complementario entre una primera porción de ARN y una segunda porción de ARN. La longitud de cada porción generalmente es de menos de 30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 ó 10 nucleótidos). En algunas realizaciones, la longitud de cada porción es de 19 a 25 nucleótidos de longitud. En algunas moléculas de ARNip, las porciones complementarias primera y segunda de la molécula de ARN son el "tallo" de una estructura en horquilla. Las dos porciones pueden unirse mediante una secuencia de unión, que puede formar el "bucle" en la estructura en horquilla. La secuencia de unión puede variar en longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de unión puede ser de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13 nucleótidos de longitud. Una secuencia de unión representativa es 5'-TTC AGA AGG-3', pero puede usarse cualquiera de varias secuencias para unir las porciones primera y segunda. Las porciones primera y segunda son complementarias pero pueden no ser completamente simétricas, dado que la estructura en horquilla puede contener nucleótidos de proyección en 3' o 5' (por ejemplo, una proyección de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos).

60 Muchos investigadores han mostrado que las moléculas de ARN son eficaces suprimiendo la acumulación de ARNm. La supresión mediada por ARNip de la expresión de ácido nucleico es específica dado que incluso un apareamiento erróneo de un único par de bases entre ARNip y el ácido nucleico diana puede suprimir la acción de interferencia por ARN. Los ARNip generalmente no provocan respuestas antivirales.

65 De manera conveniente, el ARNip es complementario a o bien una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio extracelular de ROR1 o bien una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio intracelular de

ROR1.

Preferiblemente la molécula de ARNip tiene la secuencia de ARNip tal como se muestra en la tabla a continuación:

Secuencia diana (ADNc, 5' → 3')	Secuencia de ARNip (5' → 3')	nombre de ARNip
AT GAA CCA ATG AAT AAC ATC	AAU GAA CCA AUG AAU AAC AUC	ROR 1
AAA AAT CTA TAA AGG CCA TCT	AAA AAU CUA UAA AGG CCA UCU	ROR 2
AC ATG TCA ATT CCA AAT CAT	AAC AUG UCA AUU CCA AAU CAU	ROR 3

5

En un segundo aspecto de la invención se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica para un inhibidor biológico del primer aspecto.

10 Los términos "secuencia de nucleótidos" o "ácido nucleico" o "polinucleótido" u "oligonucleótido" se usan de manera intercambiable y se refieren a un heteropolímero de nucleótidos o a la secuencia de estos nucleótidos. Esto también se refiere a ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y puede representar la hebra sentido o antisentido, para ácido nucleico peptídico (PNA) o para cualquier material de tipo ADN o de tipo ARN. En las secuencias en el presente documento A es adenina, C es citosina, T es timina, G es guanina y N es A, C, G o T (U). Se contempla que cuando el polinucleótido sea ARN, la T (timina) en las secuencias

15 proporcionadas en el presente documento se sustituya por U (uracilo). Generalmente, los segmentos de ácido nucleico proporcionados por esta invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos del genoma y ligadores de oligonucleótido cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, o a partir de nucleótidos individuales, para proporcionar un ácido nucleico sintético que puede expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico, o un gen eucariota.

20

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos tal como se describe en el segundo aspecto de la invención.

25 Plásmidos de vector procariotas típicos son: pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponibles de Biorad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU.); pTrc99A, pKK223-3, pDR540 y pRIT5 disponibles de Pharmacia (Piscataway, NJ, EE.UU.); vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A disponibles de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EE.UU.).

30 Un plásmido de vector de células de mamífero típico es pSVL disponible de Pharmacia (Piscataway, NJ, EE.UU.). Este vector usa el promotor tardío de SV40 para dirigir la expresión de genes clonados, encontrándose el mayor nivel de expresión en células T que producen antígeno, tales como células COS-1. Un ejemplo de un vector de expresión de mamífero inducible es pMSG, también disponible de Pharmacia (Piscataway, NJ, EE.UU.). Este vector usa el promotor inducible por glucocorticoides de la repetición terminal larga del virus de tumor mamario de ratón para dirigir la expresión del gen clonado.

35

Vectores de plásmido de levadura útiles son pRS403-406 y pRS413-416 y están disponibles generalmente de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EE.UU.). Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración en levadura (Ylps) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de centrómero de levadura (YCps).

40

Pueden usarse métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante y, por ejemplo controles de transcripción o traducción apropiados. Un método de este tipo implica la ligación mediante colas de homopolímero. Las colas de poli-dA (o poli-dC) de homopolímero se añaden a grupos OH en 3' expuestos en el fragmento de ADN que va a clonarse mediante desoxinucleotidil transferasas terminales. Entonces el fragmento puede aparearse con las colas de poli-dT (o poli-dG) añadidas a los extremos de un vector de plásmido linealizado. Los huecos dejados tras el apareamiento pueden llenarse mediante ADN polimerasa y los extremos libres unirse mediante ADN ligasa.

45

Otro método implica la ligación mediante extremos cohesivos. Los extremos cohesivos compatibles pueden generarse en el fragmento de ADN y vector mediante la acción de enzimas de restricción adecuadas. Estos extremos se aparearán rápidamente a través de un apareamiento de bases complementarias y las mellas restantes pueden cerrarse mediante la acción de ADN ligasa.

50

55 Un método adicional usa moléculas sintéticas denominadas ligadores y adaptadores. Los fragmentos de ADN con extremos romos se generan por la ADN polimerasa del bacteriófago T4 o ADN polimerasa I de *E. coli* que eliminan extremos 3' terminales sobresalientes y rellenan extremos 3' rebajados. Los ligadores sintéticos, trozos de ADN bicatenario de extremos romos que contienen secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción definidas, pueden ligarse a fragmentos de ADN de extremos romos mediante la ADN ligasa de T4. Se digieren posteriormente con enzimas de restricción apropiadas para crear extremos cohesivos y se ligan a un vector de expresión con extremos terminales compatibles. Los adaptadores también son fragmentos de ADN sintetizados químicamente que

60

contienen un extremo romo usado para la ligación pero que también presentan un extremo cohesivo preformado.

Los ligadores sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasa de restricción están disponibles comercialmente de varias fuentes incluyendo International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, EE.UU..

5 Un modo deseable de modificar el ADN que codifica para el polipéptido es usar la reacción en cadena de la polimerasa tal como se da a conocer por Saiki *et al* (1988) Science 239, 487-491. En este método, el ADN que va a amplificarse enzimáticamente está flanqueado por dos cebadores de oligonucleótido específicos que se incorporan por sí mismos en el ADN amplificado. Dichos cebadores específicos puede contener sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que pueden usarse para la clonación en vectores de expresión usando métodos conocidos en la técnica.

15 En un cuarto aspecto de la invención se proporciona una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos o vector de expresión tal como se describe en los aspectos segundo y tercero de la invención.

Entonces, el ADN se expresa en un huésped adecuado para producir un polipéptido que comprende el compuesto de la invención. Por tanto, el ADN que codifica para el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede usarse según técnicas conocidas, modificadas de manera apropiada en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento, para construir un vector de expresión, que entonces se usa para transformar una célula huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las dadas a conocer en las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 4.440.859 expedida el 3 de abril de 1984 a Rutter *et al*, 4.530.901 expedida el 23 de julio de 1985 a Weissman, 4.582.800 expedida el 15 de abril de 1986 a Crowl, 4.677.063 expedida el 30 de junio de 1987 a Mark *et al*, 4.678.751 expedida el 7 de julio de 1987 a Goeddel, 4.704.362 expedida el 3 de noviembre de 1987 a Itakura *et al*, 4.710.463 expedida el 1 de diciembre de 1987 a Murray, 4.757.006 expedida el 12 de julio de 1988 a Toole, Jr. *et al*, 4.766.075 expedida el 23 de agosto de 1988 de Goeddel *et al* y 4.810.648 expedida el 7 de marzo de 1989 a Stalquer, todas ellas se incorporan en el presente documento como referencia.

30 El ADN que codifica para el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede unirse a una amplia variedad de otras secuencias de ADN para la introducción en un huésped apropiado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del huésped, la manera de introducir el ADN en el huésped, y si se desea un mantenimiento episomal o una integración.

35 Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en una orientación apropiada y marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN puede unirse a las secuencias de nucleótidos de control reguladoras de la transcripción y traducción apropiadas reconocidas por el huésped deseado, aunque tales controles están disponibles generalmente en el vector de expresión. Por tanto, el inserto de ADN puede estar operativamente unido a un promotor apropiado. Los promotores bacterianos incluyen los promotores *lacI* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor *gptr*, los promotores PR y PL de fago  $\lambda$ , el promotor *phoA* y el promotor *trp*. Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina cinasa de VHS, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTR retrovirales. El experto en la técnica conocerá otros promotores adecuados. Los constructos de expresión también contendrán de manera deseable sitios para la iniciación y terminación de la transcripción, y en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. (Documento WO 98/16643)

45 Entonces, el vector se introduce en el huésped a través de técnicas habituales. Generalmente, no todos los huéspedes se transformarán por el vector y por tanto será necesario seleccionar en busca de células huésped transformadas. Una técnica de selección implica incorporar en el vector de expresión un marcador de secuencia de ADN, con cualquier elemento de control necesario, que codifica para una característica seleccionable en la célula transformada. Estos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina o G418 para un cultivo de células eucariotas, y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Alternativamente, el gen para una característica seleccionable de este tipo puede estar en otro vector, que se usa para cotransformar la célula huésped deseada.

55 Las células huésped que se han transformado por el ADN recombinante de la invención se cultivan entonces durante un tiempo suficiente y en condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas dadas a conocer en el presente documento para permitir la expresión del polipéptido, que puede recuperarse entonces.

60 El polipéptido puede recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Lo más preferiblemente, se emplea una cromatografía de líquidos de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

65 Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo (pero sin limitarse a) sistemas que emplean: bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*) transformadas con, por ejemplo, bacteriófago recombinante, vectores de

- 5 expresión de ADN plasmídico o cosmídico; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) transformadas con, por ejemplo, vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto transformados con, por ejemplo, vectores de expresión víricos (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectados con, por ejemplo vectores de expresión víricos o bacterianos; sistemas de células animales transfectados con, por ejemplo, vectores de expresión de adenovirus.
- 10 Los vectores pueden incluir un replicón procariota, tal como el Col E1 *ori*, para la propagación en un procariota, incluso si el vector va a usarse para la expresión en otros tipos de células no procariotas. Los vectores también pueden incluir un promotor apropiado tal como un promotor procariota que pueda dirigir la expresión (transcripción y traducción) de los genes en una célula huésped bacteriana, tal como *E. coli*, transformada con el mismo.
- 15 Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite la unión de ARN polimerasa y que se produzca la transcripción. Se proporcionan normalmente secuencias promotoras compatibles con huéspedes bacterianos a modo de ejemplo en vectores de plásmido que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención.
- 20 En un quinto aspecto, se proporciona el uso de un inhibidor biológico tal como se describe en el primer aspecto de la invención en la inducción de muerte celular.
- En un sexto aspecto, se proporciona un método de inducción de muerte celular en una o más células que comprende exponer una célula que expresa ROR1 a un inhibidor biológico tal como se describe en el primer aspecto de la invención.
- 25 En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un inhibidor biológico tal como se describe en el primer aspecto de la invención para su uso en medicina.
- En un octavo aspecto de la invención, se proporciona un inhibidor biológico tal como se describe en el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica.
- 30 Por "tratamiento" se incluyen los significados de que se reduce el número de células cancerosas que caracterizan la enfermedad que va a tratarse y/o se retrasa y/o previene el crecimiento adicional de células cancerosas y/o se destruyen células cancerosas.
- 35 La leucemia linfocítica crónica puede identificarse usando los criterios expuestos en el ejemplo 1 que se basan en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de neoplasias de tejidos hematopoyéticos y linfoides.
- 40 En un noveno aspecto, se proporciona el uso de un inhibidor biológico tal como se describe en el primer aspecto de la invención en la producción de un medicamento para tratar leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas de no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de páncreas y cáncer hepatocelular.
- 45 Los inhibidores biológicos pueden usarse para producir una composición farmacéutica (medicamento) que puede usarse para tratar enfermedades tales como leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas de no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de páncreas y cáncer hepatocelular.
- 50 En un décimo aspecto, se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad que comprende la etapa de administrar a un sujeto un inhibidor biológico tal como se describe en el primer aspecto de la invención, en el que la enfermedad se selecciona de leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas de no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de páncreas y cáncer hepatocelular.
- 55 El término "sujeto" significa todos los animales incluyendo humanos. Los ejemplos de sujetos incluyen humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas y cerdos. El término "paciente" significa un sujeto que tiene un trastorno que necesita tratamiento.
- 60 La enfermedad que va a tratarse puede ser progresiva, es decir, que la enfermedad empeora a lo largo del tiempo (es decir, no es estable o no mejora). En el caso de LLC, se considera que los pacientes tienen enfermedad progresiva si se cumplen los siguientes criterios: progresión durante los 3 meses precedentes de anemia relacionada con la enfermedad (hemoglobina <100 g/l), trombocitopenia (<100 x 10<sup>9</sup>/l) y/o un aumento del tamaño de bazo/hígado/ganglios linfáticos y/o aumento de más de dos veces del recuento de linfocitos en sangre, si no los
- 65 pacientes se consideraron no progresivos.



En un décimo primer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor biológico tal como se describe en el primer aspecto de la invención y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

5 Los ejemplos describen algunos métodos de producción de formulaciones farmacéuticas, sin embargo, el experto observará que la formulación más apropiada dependerá de varios factores incluyendo la vía de administración, el tipo de paciente (por ejemplo edad, peso/tamaño del paciente).

Preferiblemente la composición farmacéutica induce muerte celular en una célula que expresa ROR1.

10

En un décimo segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit de partes que comprende:

(i) un inhibidor biológico tal como se describe en el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica del mismo;

15

(ii) aparato para administrar el anticuerpo, ARNip o composición farmacéutica; e

(iii) instrucciones para su uso.

20

Las realizaciones se describen en los siguientes párrafos numerados.

1. Un inhibidor biológico de ROR1.

25

2. Un inhibidor biológico tal como se describe en el párrafo 1, en el que el inhibidor se une específicamente a o bien un dominio extracelular de ROR1, un dominio intracelular de ROR1 o bien a una secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1.

30

3. Un inhibidor biológico tal como se describe en el párrafo 1 ó 2, en el que el inhibidor se selecciona de un anticuerpo, molécula de ácido nucleico de interferencia o un receptor soluble.

35

4. Un inhibidor biológico tal como se describe en el párrafo 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo completo o un fragmento del mismo.

40

5. Un inhibidor biológico tal como se describe en cualquier párrafo anterior, en el que en el caso de la unión específica a ROR1 o la secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1, el inhibidor biológico induce muerte celular en una célula que expresa ROR1.

45

6. Un inhibidor biológico tal como se describe en cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que el dominio extracelular al que se une el inhibidor biológico tiene la secuencia de aminoácidos WNISSLNKDSILTL.

50

7. Un inhibidor biológico tal como se describe en cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que el dominio intracelular al que se une el inhibidor biológico tiene la secuencia de aminoácidos NKSQKPYKIDSKQAS.

55

8. Un inhibidor biológico tal como se describe en cualquiera de los párrafos 1 a 5, en el que la molécula de ácido nucleico de interferencia es una molécula de ARN de interferencia tal como un ARNip, un ARN antisentido o un ARNbc.

60

9. Un inhibidor biológico tal como se describe en cualquiera de los párrafos 1 a 5 y 8, en el que la molécula nucleica de interferencia es complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1 o fragmentos o variantes de la misma.

65

10. Un inhibidor biológico tal como se describe en el párrafo 9, en el que el ácido nucleico de interferencia es un polinucleótido antisentido que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1 o fragmentos o variantes de la misma.

11. Un inhibidor biológico tal como se describe en el párrafo 9 ó 10, en el que el ácido nucleico de interferencia es complementario a o bien una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio extracelular de ROR1 o bien una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio intracelular de ROR1.

12. Un inhibidor biológico tal como se describe en cualquiera de los párrafos 5 a 7, en el que el ácido nucleico de interferencia es un ARNip que tiene una secuencia seleccionada de AAUGAACCAAAGAAUACAUC, AAAAUCUAUAAAGGCCAUCU o ACAUGUCAAUUCCAAAUCAU.

13. Una secuencia de nucleótidos que codifica para un inhibidor biológico tal como se describe en cualquier párrafo anterior.

14. Un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos tal como se describe en el párrafo 13.
15. Una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos o vector de expresión tal como se describe en los párrafos 13 ó 14.
- 5 16. Uso de un inhibidor biológico tal como se define en los párrafos 1 a 12 en la inducción de muerte celular de una célula.
- 10 17. Un método de inducción de muerte celular en una o más células que comprende exponer una célula que expresa ROR1 a un inhibidor biológico tal como se define en los párrafos 1 a 12.
- 15 18. Un inhibidor biológico tal como se define en los párrafos 1 a 12, para su uso en medicina.
19. Un inhibidor biológico tal como se define en los párrafos 1 a 12, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas de no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de páncreas y cáncer hepatocelular.
- 20 20. Uso de un inhibidor biológico tal como se define en los párrafos 1 a 12, en la producción de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada de leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas de no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de páncreas y cáncer hepatocelular.
- 25 21. Un método de tratamiento de una enfermedad que comprende la etapa de administrar a un sujeto un inhibidor biológico tal como se reivindica en los párrafos 1 a 12, en el que la enfermedad se selecciona de leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas de no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de páncreas y cáncer hepatocelular.
- 30 22. Un inhibidor biológico, uso o método tal como se reivindica en los párrafos 19 a 21, en el que la enfermedad es progresiva.
- 35 23. Un inhibidor biológico, uso o método tal como se reivindica en los párrafos 19 a 22, en el que la enfermedad es leucemia linfocítica crónica.
- 40 24. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor biológico tal como se define en los párrafos 1 a 12 y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 25. Una composición farmacéutica según la reivindicación 18, que induce muerte celular en una célula que expresa ROR1.
- 50 26. Un kit de partes que comprende:
- (i) un inhibidor biológico tal como se reivindica en los párrafos 1 a 12 o una composición farmacéutica tal como se reivindica en los párrafos 24 ó 25;
- (ii) aparato para administrar el inhibidor biológico o composición farmacéutica; e
- (iii) instrucciones para su uso.
- 55 27. Un inhibidor biológico sustancialmente tal como se describe en el presente documento con referencia a los ejemplos y las figuras.
- 60 28. Un uso de un inhibidor biológico sustancialmente tal como se describe en el presente documento con referencia a los ejemplos y las figuras.
29. Un método que usa un inhibidor biológico sustancialmente tal como se describe en el presente documento con referencia a los ejemplos y las figuras.
- 65 30. Una composición farmacéutica sustancialmente tal como se describe en el presente documento con referencia a los ejemplos y las figuras.
31. Un kit de partes sustancialmente tal como se describe en el presente documento con referencia a los ejemplos y las figuras.

**Ejemplos**

5 Los siguientes ejemplos representan diversos aspectos de la invención. Se apreciará que los anticuerpos y/o antígenos específicos usados en los ejemplos sirven para ilustrar los principios de la invención y no pretenden limitar su alcance.

Los siguientes ejemplos se describen con referencia a las figuras acompañantes en las que:

10 Figura 1 - presentación esquemática del gen *ROR1* y la proteína Ror1.

El gen *ROR1* humano tiene una región codificante de 2814 pb que predice una secuencia de 937 aminoácidos y tamaño de proteína de 105 kDa incluyendo un dominio de tipo Ig, dominio rico en cisteína, dominio Kringle, dominio tirosina cinasa y dominio rico en prolina.

15 Se indican las posiciones de sitios de reconocimiento de anticuerpo de N-Ror1-Ig (RSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQ), N-Ror1-CRD (YMESLHMQGEIENQI), N-Ror1-KNG (CQPWNSQYPHTHTFTALRFP), C-Ror1-17, C-Ror1-904 (NKSQKPYKIDSKQAS) (Y) así como los dominios de proteína: dominio de tipo inmunoglobulina (Ig), dominio rico en cisteína (CRD), dominio Kringle (Kr), dominio transmembrana (TM), dominio tirosina cinasa (TK), dominio rico en serina y treonina (S/T) y dominio rico en prolina (P).

Figura 2 - Mapa del cromosoma humano 1 indicando parte de los genes sobreexpresados en B-LLC.

25 Figura 3 - Expresión génica de ROR1 (RT-PCR) en células de LLC frente a donante de control

Control positivo = producto de PCR clonado en vector pGEM-T Easy

Control negativo = mezcla de reacción sin molde

30 Figura 4 - Expresión génica de ROR1: se requiere PMA/ionomicina para inducir la expresión en linfocitos normales

Un ejemplo representativo de expresión de Ror1 en linfocitos B y T normales activados (PMA/ionomicina), células B de amígdala y células de LLC leucémicas después de 48 h de cultivo. La expresión se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El incremento en veces se relacionó en el nivel observado a tiempo cero. Las células de LLC y células B de amígdala, que expresan constitutivamente ARNm de Ror1 no pudieron activarse adicionalmente, mientras que la señal de activación fuerte indujo la expresión génica de Ror1 en células B y T normales.

40 \* = células de LLC y células B de amígdala expresaron constitutivamente ROR1 y no pudieron activarse adicionalmente

Figura 5 - Expresión de proteína Ror1 en células de LLC y controles sanos (inmunotransferencia de tipo Western)

45 Los tres anticuerpos mostraron una banda a 105 kD. C-Ror1-904 también detectó una variante estimada de 130 kDA de Ror1. Las inmunotransferencias se separaron y se tiñeron con un anticuerpo frente a beta-actina para mostrar la integridad de las muestras cargadas.

50 Figura 6 - Intensidad de tinción de superficie celular para Ror1 en comparación con CD19 en dos pacientes con LLC y un donante sano

Muestra la tinción de superficie celular para Ror1 (M-Ror1<sub>com</sub>) y CD19 de células leucémicas de pacientes con LLC progresiva y no progresiva así como PBMC de un donante sano.

55 Figura 7 - Control de especificidad de los anticuerpos policlonales.

Panel superior: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo policlonal anti-Ror1 disponible comercialmente (N-Ror1<sub>com</sub>). Ambos anticuerpos reaccionan con la misma banda de 37 kDA. La parte extracelular recombinante de la proteína Ror1 se expresó en *E. coli* y el sobrenadante se concentró 30X.

60 Panel inferior: Inmunotransferencia de tipo Western usando una proteína Ror1 recombinante disponible comercialmente diluida en serie que representa una región citoplásmica y estudiada con sonda con el anticuerpo policlonal de conejo c-Ror1-904. [El anticuerpo Ror-c-1-904 no reaccionó con la parte extracelular recombinante de la proteína Ror1 (datos no mostrados)].

65 Figura 8 - Proteína Ror1 no se fosforila en la célula B normal activada

La activación mediante PMA/ionomicina de células B normales indujo la expresión de la proteína Ror1 que no está fosforilada.

5 Panel A = Inmunotransferencia de lisados celulares de células B periféricas normales purificadas activadas con PMA/ionomicina y sometidas a prueba con AcM anti-Ror1

10 Panel B = Inmunoprecipitación (usando AcM anti-Ror1) de células B sanguíneas normales purificadas activadas con PMA/ionomicina, tratadas sin (-) o con (+) pervanadato (control pos, para inducir la fosforilación), teñidas con anticuerpo monoclonal PY99 y sometidas a prueba de nuevo con N-ROR1.

Las células B activadas con PMA/ionomicina no mostraron ninguna autofosforilación.

Figura 9 - La proteína Ror1 se fosforila constitutivamente en células de LLC.

15 Un experimento representativo de un paciente con LLC. Inmunotransferencia realizada para fosforilación proteica usando un anticuerpo monoclonal frente a fosfotirosina (PY99). Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal anti-Ror1. El anticuerpo PY99 se usó para estudiar con sonda la fosforilación con separación posterior y estudio con sonda de nuevo con el anticuerpo policlonal N-Ror1.

20 Figura 10 - Anticuerpos monoclonales anti-Ror1 indujeron apoptosis (anexina-V/PI) de células de LLC (paciente con LLC n.º 1)

25 Los anticuerpos monoclonales anti-Ror1 contra el dominio externo del receptor Ror1 inducen apoptosis de células de LLC. El patrón de apoptosis varía entre pacientes.

CRD = dominio rico en cisteína, KNG = dominio Kringle; Ig = dominio de tipo inmunoglobulina

30 Figura 11 - Anticuerpos monoclonales anti-Ror1 indujeron apoptosis (anexina-V/PI) de células de LLC (paciente con LLC n.º 2)

Los anticuerpos monoclonales anti Ror1 contra el dominio externo del receptor Ror1 inducen apoptosis de células de LLC. El patrón de apoptosis variaba entre pacientes.

35 CRD = dominio rico en cisteína, KNG = dominio Kringle; Ig = dominio de tipo inmunoglobulina

Figura 12 - El anticuerpo IgG anti-Ror1 indujo citotoxicidad en ADCC de células de LLC.

40 ADCC (18 h) usando AcM anti-Ror1 y línea celular EHEB LLC como PBMC de donante objetivo y normal sano como células efectoras

ADCC (18 h) usando AcM anti-Ror1 y células de LLC como objetivo y células NK singénicas como células efectoras. Se usan resultados de tres pacientes diferentes

45 Figura 13 - El anticuerpo IgG anti Ror1 induce muerte celular de líneas celulares tumorales que se originaron a partir de cáncer de pulmón (A549) y cáncer de próstata (DU145)

50 El tratamiento de tanto la línea celular de cáncer de pulmón A549, como de la línea celular de cáncer de próstata DU145 con el anticuerpo KNG y anticuerpo de reticulación induce muerte celular significativa en comparación con anticuerpo de control.

Figura 14 - El tratamiento *in vivo* con anticuerpos IgG anti-Ror1 agota las células de LLC primarias injertadas en ratones SCID

55 Se injertaron PBMC de un paciente con LLC gravemente afectado en ratones SCID. El tratamiento con AcM anti-ROR agotó totalmente las células humanas del peritoneo de los ratones.

Figura 15 - Regulación por disminución mediante ARNip de ARNm de Ror1 medido mediante RT-PCR en LLC

60 Regulación por disminución mediada por ARNip de ARNm de Ror1 tal como se mide mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células de LLC.

Figura 16 - Silenciamiento por ARNip de la apoptosis inducida por Ror1 de células de LLC

65 El silenciamiento de Ror1 mediado por ARNip dio como resultado apoptosis específica de células de LLC. Resultados de tres pacientes diferentes (se usaron tres constructos de ARNip diferentes).

Figura 17 - Secuencias de  $V_L$  y  $V_H$  para anticuerpo Ig24 anti-Ror1 (clon 2A4)

Figura 18 - Secuencias de  $V_L$  y  $V_H$  para anticuerpo CRD16 anti-Ror1 (clon 1C11)

5 Figura 19 - Secuencias de  $V_L$  y  $V_H$  para KNG20 anti-Ror1 (clon 4C10)

Figura 20 - PBMC de superficie celular de PBMC de donante sano

Se llevó a cabo usando seis anticuerpos anti-ROR1, 2A4, 1C11, 4A7, 3B8, 1D8 y 4C10.

10 Figura 21 - Tinción de superficie celular de linfocitos de LLC

Se llevó a cabo usando seis anticuerpos anti-ROR1, 2A4, 1C11, 4A7, 3B8, 1D8 y 4C10.

15 Figura 22 - Comparación de frecuencia de células teñidas con anticuerpos anti-ROR1 para pacientes con LLC y donantes sanos

Figura 23 - Comparación de frecuencia de células teñidas con anticuerpos anti-ROR1 para enfermedad de LLC progresiva y no progresiva

20 Figura 24 - Anticuerpos monoclonales anti-Ror1 indujeron apoptosis (anexina-V/PI) de células de LLC

Comparación de seis anticuerpos anti-ROR1, 2A4, 1C11, 4A7, 3B8, 1D8 y 4C10

25 Figura 25 - Escisión de PARP en células de LLC

Gel que muestra PARP escindido en respuesta a anticuerpos anti-ROR1 en comparación con rituximab, anticuerpo murino y sin controles de anticuerpo.

30 Ejemplo 1-Generación de anticuerpos específicos de Ror1

*Generación de anticuerpos anti-Ror1*

35 Se generaron anticuerpos monoclonales de ratón frente a cuatro péptidos sintéticos representados en la tabla 1. Se adquirieron péptidos de calidad inmunológica de Thermo Electron Corporation (GmbH, Ulm, Alemania). Se usaron péptidos conjugados con hemocianina de lapa californiana (KLH) para generar anticuerpos monoclonales (AcM) de ratón según el protocolo convencional con modificaciones menores (Kohler y Milstein C, (1975) Nature 256 págs. 495-7).

40 Se determinó la especificidad de los anticuerpos monoclonales generados mediante ensayo ELISA usando péptidos y proteínas irrelevantes así como la línea celular COS-7 transfectada con el gen de Ror1.

*Tabla 1. Péptidos de Ror1 usados para la generación de anticuerpos monoclonales*

Péptido	Secuencia	Ubicación	Clase de AcM producido
Ig24	RSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQ	108-130	IgM
CRD16	YMESLHMQGEIENQI	188-202	IgM, IgG1
KNG20	CQPWNSQYPHTHTFTALRFP	334-353	IgM, IgG1

45 *Preparación de péptidos inmunogénicos*

50 Se preparó un péptido y KLH (Sigma) mezclando 1 mg de péptido con 5 mg de KLH en 1,03 ml de agua desionizada, después de eso, se añadieron 400  $\mu$ l de PBS a la disolución de KLH y péptido. Tras 2 min de mezclado, se añadieron 1,2  $\mu$ l de glutaraldehído al 25%. Se agitó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Se almacenó el péptido conjugado a -20°C para su uso posterior. Se realizó el mismo procedimiento para la conjugación de péptido con BSA.

55 Para comprobar la eficacia de conjugación, se mezclaron 10  $\mu$ l de cada péptido-KLH y péptido-BSA con 5  $\mu$ l de tampón de muestra y se sometieron a ebullición durante 2-5 min y se enfriaron en hielo. Se realizó la electroforesis usando gel de SDS-PAGE al 10% con un instrumento de electroforesis mini-PROTEAN (Bio-Rad) de 100 mA durante 1 hora. Se tiñó el gel con azul de Coomassie R-250 (Sigma). El cambio en el desplazamiento de movilidad de KLH y BSA conjugado y no conjugado representa la eficacia de conjugación.

60 *Protocolo de inmunización*

5 Se usaron cuatro ratones BALB/c para cada inmunización con péptido. Se inmunizó cada ratón 5 veces con un intervalo de dos semanas. Se realizó la primera inmunización con 100 µg de conjugado de péptido mezclado a una razón 1:1 con adyuvante completo de Freund inyectado de manera intraperitoneal en un volumen que no supera 100 µl. Para las inmunizaciones posteriores, se mezclaron 50 µg de péptido-KLH con adyuvante incompleto de Freund.

10 Una semana antes de la última inmunización, se recogió sangre mediante una incisión vertical de la cola. Se preparó suero y se comprobaron anticuerpos específicos usando ELISA. Tres días antes de la fusión celular, se inyectaron por vía intravenosa 20 µg de KLH-péptido sin ningún adyuvante.

#### *ELISA de suero*

15 Se recubrió cada pocillo con 20 µg/ml del péptido de inmunización en PBS. Se incubaron las placas de ELISA a 37°C durante una hora y después de eso durante la noche a 4°C. El siguiente día se lavaron las placas 3 veces con tampón PBS/Tween durante 5 min, se bloquearon con BSA al 2,5% a 37°C durante 1,5 h y después de eso se lavaron de nuevo x3 con tampón PBS/Tween.

20 Se diluyó el suero en serie con PBS (1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000). Se añadió un volumen total de 100 µl a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 1,5 h, tras lo cual se lavaron las placas. Como anticuerpo secundario se usaron 100 µl de anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón conjugado HRP diluido 1:1000. Tras lavar se añadieron 100 µl de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo y se incubaron las placas a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Tras 15 min se detuvo la reacción añadiendo 30 µl de disolución de parada (ácido sulfúrico 0,16 M) a cada pocillo. Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm usando un lector de ELISA. Los ratones con una respuesta de anticuerpos adecuada estaban listos para la fusión y generación de hibridomas.

#### *Producción de hibridomas*

30 Se usó la línea celular SP2/0 de mieloma de ratón para generar el hibridoma. Se cultivaron células en RPMI (GIBCO) y FBS al 10% hasta alcanzar >70% de confluencia.

35 Un día antes de la fusión celular, se aislaron macrófagos peritoneales BALB/C murinos mediante lavado peritoneal de 5 ml de RPMI. El fluido peritoneal aislado se lavó dos veces con RPMI. Se incubaron las células en RPMI y FBS al 20% durante 24-48 h a 37°C con el 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiraron los bazo del ratón inmunizado en condiciones estériles. Para adquirir una única suspensión celular, se inyectaron 10 ml de RPMI en el bazo desde diferentes ángulos. Se lavaron las células recogidas con RPMI durante 10 min y se centrifugaron a 1000 rpm.

40 Se seleccionó un tubo Falcon estéril de 50 ml y se mezclaron células SP2/0 con las células del bazo a una razón de 1:10 (1 célula SP2/0 y 10 células de bazo). Se lavó la mezcla dos veces en RPMI. Se añadieron 800 µl de PEG 1500 al 50% (Sigma) precalentado (37°C) al sedimento celular lentamente mezclando al mismo tiempo. Inmediatamente tras añadir PEG, se añadieron 20 ml de RPMI precalentado. Se lavaron las células dos veces a 500 rpm. Se añadió medio HAT selectivo al sedimento (2x10<sup>6</sup> células/ml) y se sembraron las células en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células a 37°C con el 5% de CO<sub>2</sub> y se hicieron crecer y se examinó diariamente la formación de colonias. Aparecieron colonias tras 5-10 días. Una vez que el diámetro de la colonia alcanzó 1 mm, se determinó la presencia de anticuerpo contra el péptido inmunizado mediante ELISA. Tras dos semanas de incubación se recogieron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo y se realizó el ensayo ELISA usando péptido solo, KLH-péptido, BSA-péptido y KLH sólo como antígeno de recubrimiento.

#### *Purificación de anticuerpos*

50 Se purificaron los anticuerpos monoclonales mediante cromatografía de afinidad basándose en sus isotipos. Para las subclases de IgG se usó una columna de proteína G Hi-Trap (Pharmacia Biotech). En resumen, se cultivaron los hibridomas en RPMI con FBS al 10% y se recogieron los sobrenadantes cada 36 h. Se esterilizaron por filtración los sobrenadantes (45 nm) y se ajustó el pH a 7,5 añadiendo 10x tampón PBS antes de cargar en la columna de proteína G.

60 Se realizó la elución usando glicina 0,1 mol/l pH: 2,7. Se ajustó el pH del anticuerpo eluido a 7,0 con tampón Tris 1 mol/l pH: 9,0. Se dializó el anticuerpo eluido con PBS pH: 7,5. El método para la purificación de anticuerpos de IgM era el mismo que para anticuerpos de IgG excepto porque la columna de afinidad era una Sepharose 4B-anticuerpo de conejo anti-IgM de ratón.

65 Las secuencias para los tres anticuerpos monoclonales generados se encuentran en las figuras 17 a 19. Las secuencias de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> del anticuerpo Anti-Ror1 Ig24 (clon 2A4) se encuentran en la figura 17. Las secuencias de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> del anticuerpo Anti-Ror1 CRD16 (clon 1C11) se encuentran en la figura 19. Las secuencias de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> del anticuerpo Anti-Ror1 KNG20 (clon 4C10) se encuentran en la figura 19.

Ejemplo 2- Aislamiento de células

*Pacientes*

5 Se aplicó la Clasificación de Neoplasias de los Tejidos Linfoides y Hematopoyético de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Harris NL *et al.*, Histopathology 2000; 36:69-86). El diagnóstico de LLC (n=100) se basó en inmunofenotipado (CD5+/CD19+/CD23+/IgM+) y la presencia de  $>5,0 \times 10^9$  linfocitos por l en sangre periférica.

10 Se consideró que los pacientes con LLC tenían enfermedad progresiva según una modificación de los criterios del comité del NCI National Cancer Institute (Sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukaemia: revised guidelines for diagnoses and treatment. Cheson B *et al.*, Blood 87, 4990-4997, 1996), si había una progresión durante los 3 meses anteriores en la anemia relacionada con la enfermedad (hemoglobina  $<10,0$  g/dl), trombocitopenia ( $<100 \times 10^9/l$ ) y/o un aumento en el tamaño de bazo/hígado/ganglios linfáticos y/o un aumento de  
15 más de dos veces en el recuento de linfocitos sanguíneos. Cuando no se cumplían estos criterios, se consideró que los pacientes tenían enfermedad no progresiva.

Se recogió médula ósea o sangre periférica con citrato o heparinizada de pacientes con LLC y también se extrajo sangre de donantes sanos normales (n=10). Se recogieron todas las muestras con el consentimiento informado y la  
20 aprobación del comité ético local.

*Aislamiento de células mononucleares, granulocitos, linfocitos B y T de la sangre*

25 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células mononucleares de médula ósea (BMMC) usando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hipaque (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) tal como se describió previamente (Rezvany MR *et al.*, Br J Haematol 2000; 111:608-17).

30 Se recuperaron granulocitos de la parte superior de la capa de eritrocitos tras la centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hipaque. Se lisaron los eritrocitos mediante hipoosmosis en agua fría. Más del 98% de las células nucleadas eran granulocitos tal como se evaluó mediante inmunocitología (datos no mostrados).

35 Se cortó tejido de amígdala y se hizo pasar a través de una rejilla de metal y se preparó una suspensión de células mononucleares de amígdala mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hipaque (Rezvany MR *et al.*, Br J Haematol 2000; 111:608-17).

Se purificaron linfocitos T y B a partir de PBMC mediante selección negativa usando perlas MACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

40 También se enriquecieron células B leucémicas y células mononucleares de amígdala usando purificación con lana de nailon (Rezvany MR *et al.*, Br J Haematol 2000; 111:608-17). Se analizó la pureza de las células mononucleares aisladas mediante inmunofluorescencia directa usando anticuerpos monoclonales (AcM) conjugados contra CD3, CD19 y CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) y citometría de flujo (FACSCalibur BD Biosciences).

*Resultados*

45 Las PBMC de todos los pacientes con LLC (n = 100) así como las BMMC (n = 2) expresaban *ROR1* al nivel del ARNm. *ROR1* se expresaba débilmente también en células B de amígdala normales (2/2) pero no en PBMC de donantes sanos (0/10), células B normales aisladas (0/6) y células T (0/3) o granulocitos sanguíneos enriquecidos (0/10) (tabla 2).  
50

*Tabla 2. Expresión del gen ROR1 (RT-PCR) en pacientes con LLC y donantes de control sanos*

<i>Fuente de células</i>	<i>casos positivos/total analizados</i>
<u>LLC</u>	
PMBC	100/100
BMMC	2/2
<u>Donantes sanos</u>	
PBMC	0/10
Células T*	0/3
Células B*	0/6
Células B de amígdala*	2/2
Granulocitos**	0/10

\*Pureza > 90%

\*\* Pureza > 98%

PBMC = células mononucleares de sangre periférica, BMMC = células mononucleares de médula ósea

Ejemplo 3 - Amplificación por RT-PCR

*Amplificación por RT-PCR y RT-QPCR de ROR1*

- 5 Se realizó la amplificación por RT-PCR usando cebadores específicos de *ROR1* (tabla 3). El perfil de amplificación incluía 5 min de desnaturalización a 95°C seguido por 35 ciclos de 94°C, 60°C y 72°C durante 30 s cada uno, usando ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).
- 10 Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (RT-QPCR) tal como se describió previamente (Mikaelsson E *et al.*, Blood 2005; 105:4828-35). El perfil de amplificación incluía 5 min de desnaturalización a 95°C seguido por 35 ciclos de 94, 60 y 72°C durante 30 s cada uno usando ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Appl. Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Para detalles adicionales véase Mikaelsson *et al.*, Blood 105, 4828, 2005.
- 15 *Tabla 3. Cebadores y sondas usados en amplificaciones y cuantificaciones por PCR de ROR1*

<i>Diana</i>	<i>Cebador (5'→3')</i>	<i>Posición</i>	<i>Tamaño de amplificación (pb)</i>	<i>Referencia</i>
t-Ror1 (truncado)	S: CCAAAGGACCTTCTGCAGTGGAA (P10)	687-709	450	(10)
	AS: TCTCATTCCAGCACTCTGTCATGAGG (P9)	1111-1136		
<i>ROR1</i> (RT-PCR)	S: CTGCTGCCCAAGAAACAGAG (P1)	455-474	545	g.b. M97675
	AS: CATAGTGAAGGCAGCTGTGATCT (P2)	977-999		
$\beta$ -actina (RT-PCR)	S: ATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTC	707-730	215	g.b. NM_001101
	AS: ATGATGGAGTTGAAGGTAGTTTCG	898-921		
<i>ROR1</i> (RT-QPCR)	S: AAAGAGCTACCTCTTTCTGCTGTACG (P3)	1771-1796	175	g.b. M97675
	AS: CTTCTTGTTGAAATTCGGTCCATTG (P4)	1921-1945		
	Sonda: QCATGCTCAGCTGGTTGCTATCAAGACC 9	1869-1896		
$\beta$ -actina (RT-QPCR)	S: CGACAGGATGCAGAAGGAGA	929-948	161	g.b. NM_001101
	AS: CGTCATACTCCTGCTTGCTG	1070-1089		
	Sonda: QAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAG 9	975-1001		
<i>ROR1</i> (RT-PCR) (Dominio extracelular)	S: ATGAATAACATCACCACGTCTCTGGGCC (P5)	565-592	1005	g.b. M97675
	AS: CTCCTTGGAATCCTTTGAATCGCA (P6)	1546-1569		
<i>ROR1</i> (RT-PCR)	S: TTCTTCATTTGCGTCTGTCG (P7)	1642-1661	1116	g.b. M97675



(Dominio cinasa)	AS: CTGGCTCGGGAACATGTAAT (P8)	2738-2757
------------------	-------------------------------	-----------

S = sentido, AS = antisentido, Q = Azul-6-FAM, 9 = TAMRA, P1-P8 = número de cebador como en la figura 1, g.b. = Genbank

*Resultados*

En la figura 3 se muestran experimentos de RT-PCR representativos de donantes sanos y pacientes con LLC.

Ejemplo 4 - Secuenciación

*Secuenciación de retransposiciones V(D)J de inmunoglobulina clonales y ROR1*

Se realizó la amplificación de las retransposiciones V(D)J de inmunoglobulina mediante PCR usando ADNc de PBMC, cebadores de familia VH consenso como cebadores sentido y cebador de cadena  $\mu$  constante como cebadores antisentido. El método se ha descrito en detalle previamente (Kokhaei P *et al.*, Exp Hematol 2007; 35:297-304; Willems P, *et al.*, Belgium-Dutch Hematology-Oncology Group. Blood 2000; 96:63-70). La amplificación incluía 5 min de desnaturalización a 95°C seguido por 40 ciclos a 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s usando ADN polimerasa Ampli Taq Gold. Se usaron cebadores específicos de la familia génica CH (véase Kokhaei *et al.*, Exp Hematol 2007, 35, 297).

Se amplificaron por separado mediante RT-PCR dominios tanto extracelulares como intracelulares del gen *ROR1* gene. El perfil de amplificación incluía 5 min de desnaturalización a 95°C seguido por 35 ciclos a 94, 60 y 72°C durante 30 s cada uno usando ADN polimerasa Ampli Taq gold (Mikaëlsson *et al.*, Blood 2005, 105, 4828) usando ADNc de pacientes con LLC y se clonó en el vector pGEMT (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y se secuenció. Dominio extracelular. Sentido: ATGAATAACATCACACGTCTCTGGGCC; antisentido: CTCCTTGAATCCTTTGAATCGCA. Dominio intracelular, sentido: TTCTTCATTTGCGTCTGTGTCG; antisentido: CTGGCTCGGGAACATGTAAT. Se compararon visualmente las secuencias con el gen *ROR1* (ID de Ensembl; ENSG00000185483).

*Secuenciación del gen ROR1*

Se alisaron PBMC de pacientes con LLC, se preparó ARN total y se sintetizó ADNc tal como se describió anteriormente. Se diseñaron cebadores específicos de *ROR1* para amplificar t-Ror1 truncado (cebadores P9 y P10), los dominios extracelulares incluyendo Ig, CRD y dominios Kringle (cebadores P5 y P6), así como el dominio cinasa (cebadores P7 y P8). Se clonaron los productos de PCR en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se sometieron a secuenciación usando cebadores de T7, Sp6 y específicos de gen (tabla 3).

*Resultados*

Se analizó el análisis de mutación de dominios cinasa extracelulares y citoplasmáticos del gen *ROR1* en 10 pacientes con LLC y no mostraron aberraciones genómicas importantes. Sólo se encontraron unas pocas mutaciones puntuales (mutaciones silenciosas) (datos no mostrados). La amplificación por PCR para detectar un *ROR1* truncado (t-Ror1) usando los cebadores P9 y P10 no dio lugar a ningún amplicón (datos no mostrados). Secuencia Ror. truncado, sentido: CCAAGGACCTTCTGCAGTGGAA; antisentido: TCTCATTCCAGCACTCTGTCATGAGG.

Ejemplo 5 - Expresión de ROR1

*Activación de linfocitos B y T de donantes sanos y células B-LLC*

Se cultivaron células de LLC, células T y B aisladas normales, así como células B de amígdala en placas de cultivo de 6 pocillos (4x10<sup>6</sup> células/pocillo) en 2 ml de medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) complementado con suero AB humano al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM durante 48 horas a 37°C en aire humidificado con el 5% de CO<sub>2</sub> y se estimularon con PMA 25 ng/ml + ionomicina 1 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).

Tras 48 horas de cultivo se recogieron las células, se aisló el ARN y se preparó ADNc. Se analizó la expresión de *ROR1* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-QPCR) usando cebadores y condiciones descritos anteriormente. Se usó la expresión de  $\beta$ -actina como control endógeno para cuantificar la expresión de *ROR1*.

*Producción de anticuerpos anti-Ror1 y pruebas de especificidad*

Se produjeron anticuerpos policlonales de conejo anti-Ror1 humano a partir de NKSQKPYKIDSKQAS aa 904-918 de Ror1 humano (designado anticuerpo C-Ror1-904).

Se produjeron anticuerpos policlonales según un método modificado de Hay H (J Clin Lab Immunol 1989; 29:151-5). Se les inyectaron a conejos de menos de 6 meses de edad por vía i.m. (intramuscular) 125 µg de KLH-péptido emulsionado en adyuvante completo de Freund (Sigma. St. Louis, MO, EE.UU.). Se recogieron muestras de suero antes de las inyecciones para titulación posterior. Se administraron inyecciones de refuerzo (125 mg en adyuvante incompleto de Freund) a intervalos de 2 semanas. Tras la 4ª inyección, se sometieron a prueba los sueros para detectar la presencia de anticuerpos anti-péptido en ELISA. Se reforzaron conejos con los mayores títulos de anticuerpo con dos inmunizaciones adicionales. Se purificaron por afinidad los sueros usando columna de Sepharose 4B activada (Pharmacia, Uppsala, Suecia) conjugada con péptido. El dializó el anticuerpo eluido frente a PBS (0,15 M. pH 7,2) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Se adquirieron péptidos de calidad inmunológica de Thermo Electron Corporation GmbH, Ulm, Alemania. Se usaron péptidos conjugados con hemocianina de lapa californiana (KLH) para generar los anticuerpos policlonales. Se purificaron los anticuerpos policlonales mediante purificación por afinidad.

Una proteína recombinante que representa una región intracelular de Ror1 con un peso molecular de alrededor de 70 kD (Carna Biosciences, Inc., Chuo-ku, Kobe, Japón) para el control de la especificidad del anticuerpo policlonal C-Ror1-904.

En resumen, se amplificó por PCR la región usando un gen de Ror1 EN1031\_D08 de clon de ADNc de longitud completa humano (Origene Technologies, Inc., Rockville, Mariland, EE.UU.) como molde. Se clonaron los productos de PCR en el vector pGEM-T easy y se subclonaron en el vector pcDNA3.1+ (Invitrogen) y se transformaron en la cepa de *E. coli* Origami (Invitrogen). Se verificó la integridad del inserto mediante secuenciación de ADN. Tras seleccionar un clon en marco, se recogió el sobrenadante de bacterias cultivadas 24 h y se concentró 30 veces usando unidades de filtro de centrífuga Amicon Ultra-15 (separación de polipéptidos >10 kDa) (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU.). Se sometió el recombinante concentrado a inmunotransferencia de tipo Western y se estudió con sonda con anticuerpo anti-Ror1 (anticuerpo policlonal de cabra anti-Ror1 (N-Ror1<sub>com</sub>) (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.)) para determinar la reactividad específica.

#### *Inmunotransferencia de tipo Western*

Se usaron el anticuerpo policlonal de cabra anti-Ror1 (N-Ror1<sub>com</sub>) (R&D systems) así como los anticuerpos producidos en el laboratorio (C-Ror1-904) en una inmunotransferencia de tipo Western.

Se lisaron las células en un tampón que contenía Triton X-100 al 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y cóctel inhibidor de proteasas al 1% (Sigma). Se midió la concentración de proteína mediante el kit de ensayo de proteína BCA de Thermo Scientific (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se ejecutaron cincuenta microgramos de lisados celulares en un gel de Bis-Tris SDS-PAGE al 10% (Invitrogen) a 120 V durante 3 h en condiciones reductoras.

Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas resueltas sobre membranas Immobilon-PVDF (Millipore Corporación) en una célula mini Transblot (Invitrogen). Se bloquearon las membranas durante 1,5 h a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% en PBS más Tween 20 al 0,05% (PBS-T). Se realizaron todas las inmunotinciones en PBS-T complementado con leche desnatada al 5%. Se incubaron los filtros con diluciones apropiadas de los anticuerpos anti-Ror1 durante la noche a +4°C.

Tras un lavado extenso con PBS-T, se incubaron los filtros con inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) durante 1,5 h a temperatura ambiente seguido por lavado y revelado con un sistema de detección de la quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare).

#### *Tinción de superficie y citometría de flujo*

Se analizaron células mediante citometría de flujo (FACSCalibur BD Biosciences) usando N-Ror1<sub>com</sub> (anticuerpo primario), anti-CD3 conjugado con (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.), anti-CD19 conjugado con PE-Cy5 (e-Bioscience, San Diego, CA, EE.UU.), anti-CD19 conjugado con FITC (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.), anticuerpo de cerdo anti-IgG de cabra conjugado con FITC (anticuerpo secundario) (Southern biotech, Birmingham, AL, EE.UU.) y suero de ratón (suero de bloqueo) (DakoCytomation).

Se realizó la tinción de superficie de células de LLC y PBMC normales tal como se describe (Rezvan MR *et al.*, Br J Haematol 2001; 115:263-71). En resumen, se lavaron 2x10<sup>6</sup> células en PBS y se preincubaron con RPMI sin suero (Invitrogen), a 37°C durante 1 h seguido por tres lavados con RPMI. Se añadió un microgramo del anticuerpo anti-Ror1 (N-Ror1<sub>com</sub>) (R&D systems) y se incubó a +4°C durante 30 min.

Se lavaron las células dos veces con tampón FACS (PBS, azida de sodio al 0,1%, y FBS al 0,5%). Se añadió anticuerpo de cerdo anti-IgG de cabra con FITC (1:100) (Southern biotech) y se incubó a +4°C durante 30 min adicionales. Se realizó el bloqueo añadiendo 10 ml de suero de ratón al 10% seguido por incubación a +4°C durante

20 min. Entonces se añadieron los anticuerpos tanto CD3 como CD19 a las células y se incubaron a +4°C durante 30 min. Se lavaron finalmente las células dos veces con tampón FACS y se fijaron añadiendo paraformaldehído al 1% en PBS.

- 5 Se usó el programa de software CellQuest (BD Biosciences) para determinar el porcentaje de células Ror1+ de la población de CD19.

*Resultados*

10 *Control de especificidad de anticuerpos*

Los anticuerpos purificados por afinidad en comparación con un anticuerpo policlonal disponible comercialmente indican que los anticuerpos purificados por afinidad reconocen específicamente Ror1 (figura 7).

15 *Expresión de ROR1 en células activadas*

Después de eso, se analizó si *ROR1* podría inducirse tras activación *in vitro*. Se cultivaron células de LLC, linfocitos B y T normales y células B de amígdala con PMA/ionomicina durante 48 h para proporcionar una señal de activación fuerte. Células de LLC y células B de amígdala normales, que expresaban de manera constitutiva ARNm de Ror1, no pudieron activarse adicionalmente.

En cambio, se observó un aumento de 15-25 veces en la expresión de ARNm de *ROR1* en células By T normales activadas *in vitro*. En la figura 4 se muestra un experimento representativo. Las células B normales activadas también expresaban Ror1 al nivel de proteína (inmunotransferencia de tipo Western) (figura 8).

25 *Expresión de proteína Ror1*

Se analizó la expresión de proteína Ror1 en LLC (n=18). Los análisis de inmunotransferencia de tipo Western de lisados de células demostraron en todas las muestras de LLC la presencia de dos bandas específicas de Ror1, de 105 y un tamaño estimado de 130 kDa, respectivamente (figura 5).

El anticuerpo disponible comercialmente (N-Ror1<sub>com</sub>) parecía no detectar la variante de Ror1 de 130 kDa estimada.

En las figuras 6, 20, 21, 22 y 23 y la tabla 4 se muestra la expresión de superficie de Ror1 en pacientes con LLC progresiva y no progresiva.

Las figuras muestran que los anticuerpos anti-ROR1 se unen preferentemente a células de pacientes con LLC y no a células de pacientes sanos. Todos los anticuerpos podían unirse a células de LLC pero los anticuerpos específicos para CRD parecen ser de uso particular. La tinción de la superficie celular para Ror1 era significativamente superior en pacientes con enfermedad progresiva en comparación con no progresiva así como en pacientes con genes de IgVH no mutados en comparación con mutados.

Tabla 4. Expresión de proteínas de ROR1 en pacientes con LLC (n=18) en relación con el estado de mutación de IgVH y la fase clínica.

Pacientes	Fase de la enfermedad	Estado de mutación de IgVH	Inmunotransferencia de tipo Western		Frec. (%) of Ror1+ células de LLC (CD19+)	Ror1 MFI
			N-Ror1 <sub>com</sub> (kDa)	C-Ror1-904 (kDa)		
LLC-1	No progresiva	M	105	105, 130	80	13
LLC-2	No progresiva	UM	105	105, 130	91	25
LLC-3	No progresiva	UM	105	105, 130	36	10
LLC-4	No progresiva	M	105	105, 130	86	20
LLC-5	No progresiva	UM	105	105, 130	80	26
LLC-6	No progresiva	M	105	105, 130	91	35
LLC-7	No progresiva	UM	105	105, 130	37	14
LLC-8	No progresiva	M	105	105, 130	50	20
LLC-9	No progresiva	M	105	105, 130	69	20
LLC-10	Progresiva	M	105	105, 130	63	10
LLC-11	Progresiva	M	105	105, 130	65	11

LLC-12	Progresiva	UM	105	105, 130	81	15
LLC-13	Progresiva	M	105	105, 130	84	14
LLC-14	Progresiva	UM	105	105, 130	92	45
LLC-15	Progresiva	M	105	105, 130	61	19
LLC-16	Progresiva	M	105	105, 130	36	18
LLC-17	Progresiva	M	105	105, 130	79	20
LLC-18	Progresiva	UM	105	105, 130	93	33
Media ± EEM					71±5	20±2
Donantes de control sanos (n=10)			< 0,1	< 0,1	<0,1	

M = mutado, UM = no mutado; MFI = intensidad de fluorescencia media

La frecuencia de células de LLC CD19<sup>+</sup> que expresan Ror1 varió (71 ± 5%) (Media ± EEM) (Intervalo: 36-92%). No hubo diferencias entre pacientes progresivos o no progresivos o entre casos de *IgVH* mutado y no mutado (tabla 3). La intensidad de fluorescencia media (MFI) varió entre 10 y 45 con un valor de MFI medio de 20. No hubo ninguna diferencia estadística entre pacientes progresivos y no progresivos. La MFI media correspondiente de CD19 era de 26 (intervalo 9-48). Las células B normales (CD19<sup>+</sup>) de donantes sanos (n=10) eran negativas para Ror1 (<0,1%).

#### Ejemplo 6 – ARNip

#### ARNip

Los ARNip usados en este estudio se diseñaron para seleccionar como diana el gen de Ror1 usando algoritmos patentados y software disponible en el sitio web del fabricante (Dharmacon, Inc. Lafayette, CO). Se diseñaron tres ARNip que seleccionaban como diana una región distinta del marco de lectura abierto de Ror1.

Tabla 5: Gen diana: ROR1

Secuencia diana (ADNc, 5' → 3')	Secuencia de ARNip (5' → 3')	Nombre del ARNip
AT GAA CCA ATG AAT AAC ATC	AAU GAA CCA AUG AAU AAC AUC	ROR 1
AAA AAT CTA TAA AGG CCA TCT	AAA AAU CUA UAA AGG CCA UCU	ROR 2
AC ATG TCA ATT CCA AAT CAT	AAC AUG UCA AUU CCA AAU CAU	ROR 3

Se usaron los tres ARNip independientemente o en combinación (conjunto). Se sembraron en placa PBMC de pacientes con LLC de de recuento alto en placas de micropocillos de 48 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo en medio con suero reducido Opti-MEM 1™. Se transfirieron las células con los reactivos de ARNip SMARTpool (concentración final de 100 nM) usando el reactivo de transfección TransIT-TKO® (Mirus Bio Corporation, Madison, WI, EE.UU.) a una concentración final de 0,15 µl/pocillo.

Se usaron células no tratadas y células transfectadas con el conjunto de ARNip que no selecciona como diana siCONTROL como controles negativos. Se estableció la eficacia de transfección en experimentos previos usando el ARNip siGLO RISC-Free™ (Dharmacon), un ARNip que no selecciona como diana marcado fluorescentemente para prevenir la captación por el complejo RISC. Se transfectaron las células durante 4 horas y luego se transfirieron a cultivos en monocapa de fibroblastos NIH-3T3 que expresan hCD40L unido a la membrana. Se cultivaron las células durante 24-48 horas adicionales en RPMI + suero de ternero fetal al 10%.

Se examinó el silenciamiento génico mediante RT-PCR convencional o se cuantificó mediante q-PCR usando cebadores específicos para Ror1 (usando los parámetros definidos anteriormente). Se usaron los genes de mantenimiento β-actina y/o RPLP0 para la normalización. Se consideró que la expresión génica en las células transfectadas con ARNip de control, que no selecciona como diana era del 100% y se calculó la expresión génica en células tratadas con ARNip de Ror1 en relación con el control.

Se recogieron células transfectadas con ARNip o con control tras 24 ó 48 horas de cultivo y se examinaron para detectar apoptosis. Se tiñeron las células con anexina V etiquetada con FITC y yoduro de propidio (PI) y se

analizaron mediante citometría de flujo. Se consideró que células positivas para anexina-V o PI o células positivas dobles eran apoptóticas.

*Resultados*

5 El tratamiento con ARNip de células de LLC indujo una regulación por disminución muy marcada (silenciamiento) del gen Ror1 (figura 15) y una apoptosis de células tumorales que variable entre el 65-70% (figura 16).

Ejemplo 7 - Pruebas de citotoxicidad

10 *Ensayo de citotoxicidad usando los anticuerpos monoclonales Ror1*

Se descongelaron células de LLC congeladas y se separaron en Ficoll para obtener células vivas. Se usaron anticuerpos monoclonales Ror CRD (IgM), Ror KNG (IgG1) y Ror Ig24 (IgM) en el ensayo. Se usaron 10 µg/ml de anticuerpos y se diluyeron en medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) (complementado con L-glutamina, sulfato de estreptomina y sulfato de gentamicina) y se añadieron a una placa de 24 pocillos.

20 A cada pocillo se le añadieron  $1 \times 10^6$  células de LLC. Se analizaron las células con el kit de ensayo de BD anexina-V/PI apoptosis (BD) tras 18 y 36 h de incubación a 37°C usando citometría de flujo. Se lavaron las células dos veces con PBS frío y se resuspendieron las células en tampón de unión para una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se transfirieron 100 µl de las suspensiones de células ( $1 \times 10^5$  células) a un tubo de FACS de 5 ml. Se añadieron 5 µl de anexina V-FITC y PI respectivamente. Se incubaron las células durante 15 min a TA (25°C) en la oscuridad. Se añadieron 400 µl de tampón de unión a cada tubo y se analizaron las células mediante citometría de flujo.

25 *Ensayo de microcitotoxicidad convencional de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos*

30 Se sedimentaron  $2 \times 10^6$  células diana (línea de LLC EHEB) y se resuspendieron en 100 µl de 10 mCi/ml de  $^{51}\text{Cr}$  por  $10^6$  células. Se incubaron las células a 37°C durante 1 hora. Se lavaron las células tres veces con medio AIM-V y se resuspendieron en medio AIMV ( $2,5 \times 10^5$ /ml), se añadieron 20 µl ( $50 \times 10^3$ ) de la suspensión celular a una placa de microtitulación con fondo en forma de V de 96 pocillos (Nunc, Cole-Parmer Instrument, Illinois, EE.UU.).

Se añadieron números variables de células efectoras (PBMC de donante sano) en 0,1 ml de volumen para lograr razones de efector/diana (E/T) deseadas de 25:1, 12,5:1 y 6,25:1.

35 Se añadió el anticuerpo KNG (IgG1 de ratón) con una concentración de 10 µg/ml. Se diluyó el anticuerpo en medio AIM-V y se añadió en un 0,1 ml de volumen para lograr un volumen final de 200 µl en cada pocillo.

40 Para el control de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  espontánea, se añadieron 0,2 ml de medio AIM-V sólo a las células diana. Se determinó la liberación máxima añadiendo 0,2 ml de NP-40 al 1%. Tras 4, 18 y 36 h de incubación a 37°C, se centrifugó la placa a 200xg durante 5 min, y se retiraron 0,1 ml de sobrenadante para el recuento en un contador gamma.

*Resultados*

45 Anticuerpos contra diferentes dominios del receptor externo indujeron muerte celular sola y en ADCC. La citotoxicidad de anticuerpos solos varió entre el 15-50% y en ADCC se observó una mayor destrucción a las razones de efector con respecto a células diana más alta (figuras 10, 11, 12, 24 y 25).

Ejemplo 8 - Efectos *in vitro* de AcM anti-Ror1 sobre líneas celulares de cáncer a partir de tumores sólidos

50 La línea celular de cáncer de próstata DU145 y la línea celular de cáncer de pulmón A459 se habían sometido a prueba previamente como positivas para la expresión de Ror1. Por tanto, se trabajó para someter a prueba si el tratamiento de estas líneas celulares con AcM anti-Ror1 podría inducir muerte celular de manera similar a células de LLC primarias.

55 Se propagaron las líneas celulares en DMEM (Invitrogen) que contenía FCS al 10% (Invitrogen). Antes del experimento, se recogieron las células y volvieron a sembrarse a una densidad de 7000 células/pocillo junto con el anticuerpo anti-Ror1 KNG a 2 ó 20 µg/ml, un anticuerpo de control a 20 µg/ml, sólo medio o 3 concentraciones del agente citostático paclitaxel (5, 0,5, 0,05 mg/ml) como control positivo. Además, se añadieron anticuerpos de reticulación tal como se indica a un exceso de 5 molar. Se incubaron las células a 37°C, el 5% de CO<sub>2</sub>, en una atmósfera humidificada durante 48 h. Para determinar la viabilidad, se usó un kit que cuantifica el contenido en ATP, que refleja el número de células metabólicamente activas, por tanto el número de células vivas, según las instrucciones del fabricante (ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo<sup>®</sup>, Promega).

65 *Resultados*

El anticuerpo KNG reticulado indujo muerte celular en las líneas celulares tanto A549 como DU145, figura 13 (A y B). Los hallazgos indican que Ror1 es una posible diana para el tratamiento de una amplia variedad de tipos de cáncer.

5 Ejemplo 9 - Efectos *in vivo* de AcM anti-Ror1

Se aislaron PBMC de sangre periférica de un paciente con LLC gravemente afectado usando la técnica de Ficoll Hipaque. Se tiñeron las células para detectar CD19-PE y CD5-APC (BD) para enumerar las células de LLC, que se encontró que eran de alrededor del 80% de las PBMC. En comparación, sólo el 1,5% eran células T. Además, se tiñeron las células para determinar la expresión de Ror1 (anticuerpo 1A8 conjugado con FITC), que también se encontró en aproximadamente el 80% de las células. Después de eso, se inyectaron  $150 \times 10^6$  células por vía i.p (intraperitoneal) e i.v (intravenosa) en ratones C.B.17. SCID. Se trataron los ratones por vía i.p con 10 mg/kg de dos AcM anti-Ror diferentes, 1A8 y KNG, o AcM de control negativo irrelevante en el día 1, 3 y 6 tras la transferencia.

15 Se sacrificaron los ratones en el día 7 y se recogieron células intraperitoneales usando lavado intraperitoneal de 8 ml de PBS. Se tiñeron las células recuperadas del peritoneo para detectar anticuerpo anti-CD45 humano-FITC (BD).

*Resultados*

20 Ambos AcM anti-ROR1 agotaron totalmente las células de LLC del peritoneo de ratones inyectados (figura 14). Esto está en claro contraste de lo que se observó para el AcM de control y muestra que el tratamiento con anti-Ror1 agota específicamente células de LLC humanas primarias en un modelo de xenoinjerto *in vivo*.

25 Ejemplo 10 - Fosforilación de ROR1

Se aislaron células PBMC y B y se mantuvieron sobre hielo en 10 ml de RPMI-1640 durante 10 min. Se realizó estimulación con pervanadato (Sigma) tal como se describió anteriormente (Lu Y *et al*: J Biol Chem 2003; 278:40057). En resumen, se prepararon 2 ml de disolución de pervanadato fresca 1 mM (1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 99  $\mu$ l de HEPES 20 mM pH: 7,4, 20  $\mu$ l de vanadato y 1880  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O) antes de añadir las células. Se añadieron dos ml de disolución de pervanadato a 10 ml de medio RPMI-1640 que contenía las células. Se incubaron las células sobre hielo durante 1 h.

Entonces se centrifugaron las células a 1500 rpm a 4°C durante 5 min y se lavaron una vez en 1 ml de PBS enfriado con hielo. Se añadió un ml de tampón de lisis que contenía Tris 20 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 0,5%, NaCl 0,15 M, ácido desoxicólico al 0,5% y EDTA 10 mM al sedimento celular. También se añadieron inhibidor de proteinasa [Trasylol 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM] y vanadato 100  $\mu$ M (Sigma) al tampón de lisis antes de usar y se incubó sobre hielo durante 10 min. Se calentó el vanadato a 95°C durante 5 min antes de usar el tampón de lisis. Se transfirieron los lisados celulares a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 min a 4°C. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos. Se realizó inmunoprecipitación añadiendo 2-5  $\mu$ g de anticuerpo MabF3C6 al sobrenadante e incubación durante 1 h a 4°C con rotación.

Se mezclaron un volumen igual de proteína G Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y lisado celular (40:40  $\mu$ l) y se incubaron a 4°C durante la noche con rotación. Se lavaron las perlas de proteína G Sepharose tres veces con 1 ml de tampón de lisis. Se añadieron 15  $\mu$ l de tampón de carga reductor a las perlas y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo antifosfotirosina PY99 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se usó el anticuerpo N-Ror1 para volver a estudiar con sonda la proteína fosforilada.

Se usaron en los experimentos de ARNip células leucémicas añadidas a una monocapa de fibroblastos transfectados con CD40 L. Esto es un modo normal de mantener las células de LLC vivas. También se usó estimulación con CD40 L de células B normales, lo que no indujo la expresión de Ror1 en células B normales.

*Resultados*

55 Las células B normales no expresaban Ror1 mientras que una fuerte señal no fisiológica (PMA ionomicina) indujo expresión de Ror1 (figura 8). Sin embargo, la estimulación fisiológica (CD40L) no parecía inducir expresión de Ror1 en células B normales ni alterar la expresión de Ror1 en células de LLC.

Ror1 en LLC estaba fosforilada de manera constitutiva (figura 9) indicando que esta tirosina cinasa receptora podría estar implicada en la patobiología de LLC. Sin embargo, la expresión de proteína Ror en células B normales no estaba fosforilada (figura 8).

Ejemplo 11 - Formulaciones farmacéuticas preferidas y modos y dosis de administración.

65 Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la presente invención pueden administrarse usando un sistema de

administración de fármacos de liberación sostenida inyectable. Estos están diseñados específicamente para reducir la frecuencia de inyecciones. Un ejemplo de un sistema de este tipo es Nutropin Depot que encapsula hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables, una vez inyectadas, liberan rhGH lentamente a lo largo de un periodo sostenido.

5 Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante un dispositivo implantado quirúrgicamente que libera el fármaco directamente en el sitio requerido. Por ejemplo, Vitrasert libera ganciclovir directamente en el ojo para tratar la retinitis por CMV. La aplicación directa de este agente tóxico al sitio de enfermedad logra una terapia eficaz sin los efectos secundarios sistemáticos significativos del fármaco.

10 Los sistemas de terapia de electroporación (EPT) también pueden emplearse para la administración. Un dispositivo que suministra un campo eléctrico pulsado a las células aumenta la permeabilidad de las membranas celulares al fármaco, dando como resultado una potenciación significativa del suministro de fármaco intracelular.

15 También pueden administrarse polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención mediante electroincorporación (EI). La EI se produce cuando partículas pequeñas de hasta 30 micrómetros de diámetro sobre la superficie de la piel experimentan pulsos eléctricos idénticos o similares a los usados en electroporación. En EI, estas partículas se dirigen a través del estrato córneo y al interior de las capas más profundas de la piel. Las partículas pueden cargarse o recubrirse con fármacos o genes o pueden simplemente actuar como "balas" que generan poros en la piel a través de los que pueden entrar los fármacos.

20 Un método de administración alternativo es el sistema inyectable ReGel que es termosensible. Por debajo de la temperatura corporal, ReGel es un líquido inyectable mientras que a la temperatura corporal forma inmediatamente un reservorio de gel que se erosiona y disuelve lentamente dentro de polímeros conocidos, seguros, biodegradables. El fármaco activo se administra a lo largo del tiempo a medida que se disuelven los biopolímeros.

25 Pueden introducirse polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención en células mediante "péptidos troyanos". Estos son una clase de polipéptidos denominados penetratinas que tienen propiedades de translocación y pueden portar compuestos hidrófilos a través de la membrana plasmática. Este sistema permite el direccionamiento directo de los oligopéptidos al núcleo del citoplasma, y pueden ser no específicos del tipo de célula y altamente eficaces (Derossi *et al.*, 1998, Trends Cell Biol., 8, 84-87).

30 Preferiblemente, la formulación farmacéutica de la presente invención es una dosificación unitaria que contiene una dosis diaria o unidad, subdosis diaria o una fracción apropiada de las mismas, del principio activo.

35 Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de una sal de adición de ácido o base orgánico o inorgánico no tóxica, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y el paciente que va a tratarse, así como la vía de administración, las composiciones pueden administrarse a dosis variables.

40 En terapia humana, los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención pueden administrarse solos pero se administrarán generalmente en mezcla con un excipiente, diluyente o portador farmacéutico aceptable seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional.

45 Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención también pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía intraesternal, por vía intracraneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Se usan de la mejor manera en forma de una disolución acosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o glucosa suficientes para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deben estar adecuadamente tamponadas (preferiblemente a un pH de desde 3 hasta 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

50 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o múltiples dosis, por ejemplo viales y ampollas sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de la clase previamente descrita.

60 Generalmente, en humanos, la administración oral o parenteral de los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención es la vía preferida, siendo la más conveniente.

Para uso veterinario, los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención se administran como una formulación adecuadamente aceptable según la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que será la más apropiada para un animal particular.

5 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares. En general las formulaciones se preparan poniendo en asociación de  
10 manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una unidad o dosis diaria, subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, de un principio activo.

15 Un sistema de administración preferido de la invención puede comprender un hidrogel impregnado con polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención, que se porta preferiblemente sobre un tampón que puede insertarse en el cuello uterino y retirarse una vez que se ha producido un efecto de maduración cervical apropiado u otro efecto deseable sobre el sistema reproducir femenino.

20 Debe entenderse que además de los componentes particularmente mencionados anteriormente las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con respecto al tipo de formulación en cuestión.

25 Ejemplo 12 - Formulaciones farmacéuticas a modo de ejemplo

Aunque es posible que los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención se administren solos, es preferible presentarlos como una formulación farmacéutica, junto con uno o más portadores aceptables. El/los portador(es) deben ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatibles con el compuesto de la invención y no perjudiciales para los receptores de la misma. Normalmente, los portadores serán agua o solución salina que serán estériles y libres de pirógenos.

Los siguientes ejemplos ilustran formulaciones farmacéuticas según la invención en las que el principio activo son polipéptidos, polinucleótidos y/o anticuerpo de la invención.

35 Ejemplo 12A: Formulación inyectable

Principio activo	0,200 g
Tampón fosfato estéril, libre de pirógenos (pH 7,0)	hasta 10 ml

40 El principio activo se disuelve en la mayor parte del tampón fosfato (35-40°C), luego se enrasa hasta el volumen y se filtra a través de un filtro de microporos estéril dentro de un vial de vidrio ámbar de 10 ml estéril (tipo 1) y se sella con cierres y sobresellos estériles.

Ejemplo 12B: Inyección intramuscular

Principio activo	0,20 g
Alcohol bencílico	0,10 g
Glucofurool 75 <sup>®</sup>	1,45 g
Agua para inyección, c.s. hasta	3,00 ml

45 El principio activo se disuelve en el glicofurool. Entonces se añade el alcohol bencílico y se disuelve, y se añade agua hasta 3 ml. Entonces se filtra la mezcla a través de un filtro de microporos estéril y se sella en viales de vidrio de 3 ml estériles (tipo 1).



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Inhibidor biológico de ROR1 que puede inducir muerte celular en una célula que expresa ROR1, en el que dicho inhibidor biológico es un anticuerpo, y en el que el dominio extracelular al que se une el inhibidor biológico tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en YMESLHMQGEIENQI, CQPWNSQYPHTHTFTALRFP y RSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQ.
- 10 2. Secuencia de nucleótidos que codifica para un inhibidor biológico según la reivindicación 1.
3. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2, en la que las secuencias de nucleótidos que codifican para la cadena VL y VH, respectivamente, de dicho anticuerpo se muestran en una cualquiera de las figuras 17, 18 y 19.
- 15 4. Vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2 ó 3.
5. Célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos o vector de expresión según la reivindicación 2 ó 4.
- 20 6. Inhibidor biológico según la reivindicación 1 para su uso en medicina.
7. Inhibidor biológico según la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica.
8. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor biológico según la reivindicación 1, junto con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. Kit de partes que comprende:
- 30 i. un inhibidor biológico según la reivindicación 1 o una composición farmacéutica según la reivindicación 8;
- ii. aparato para administrar el inhibidor biológico o la composición farmacéutica; e
- iii. instrucciones para su uso.

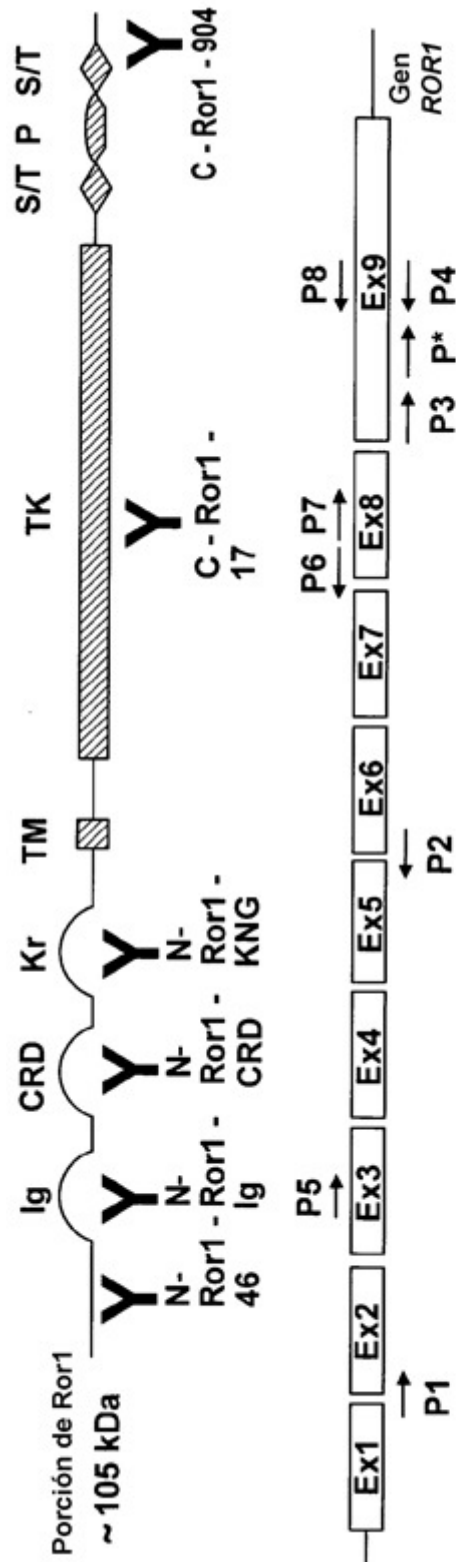


Fig. 1

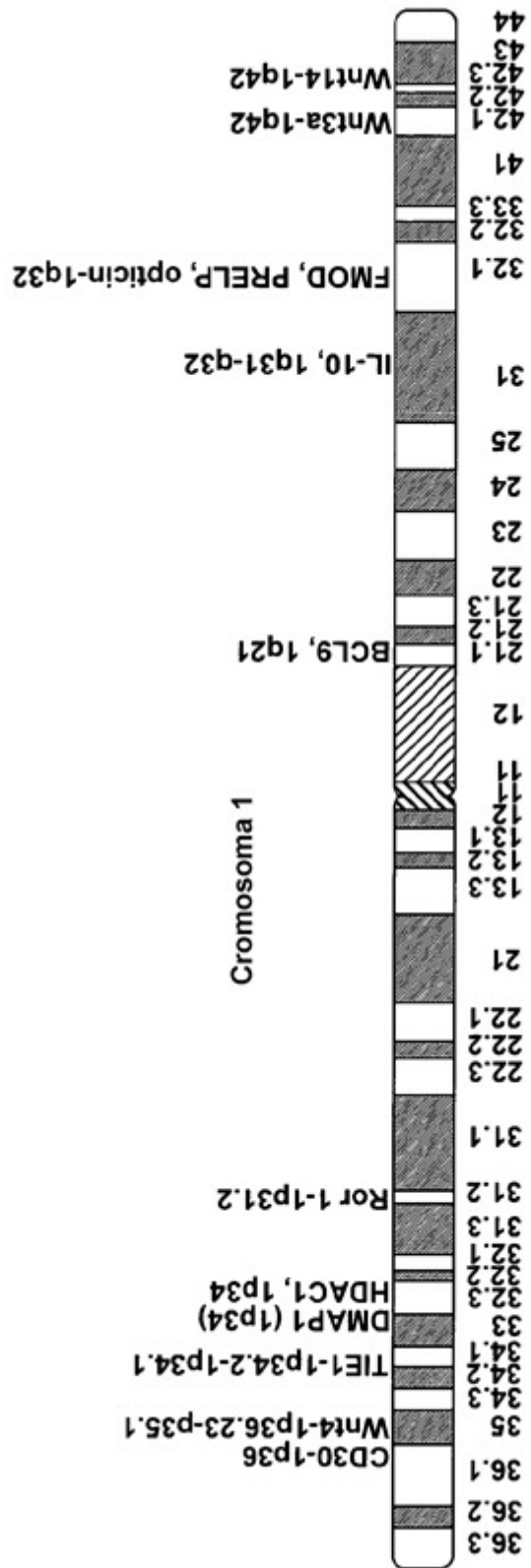


Fig. 2

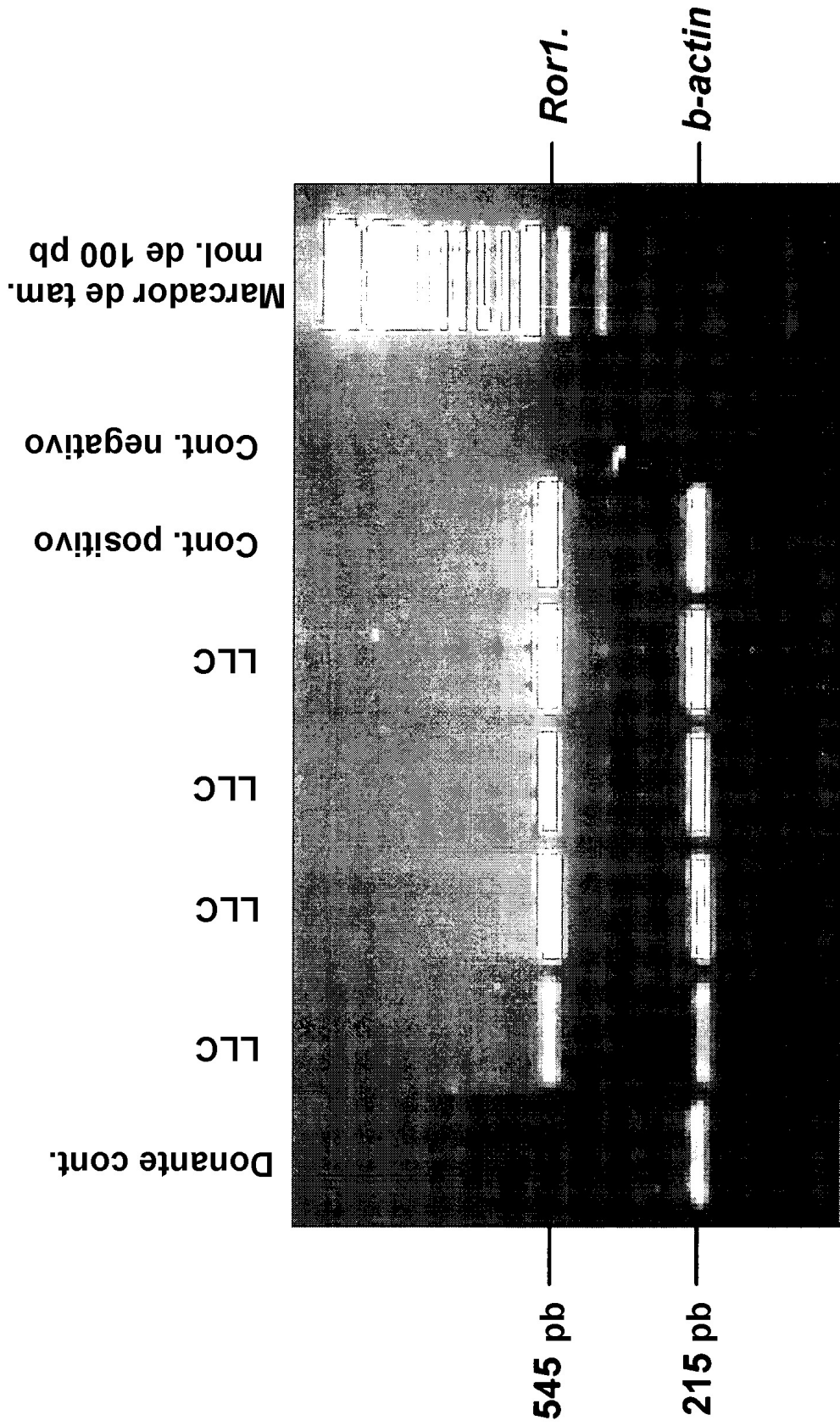


Fig. 3

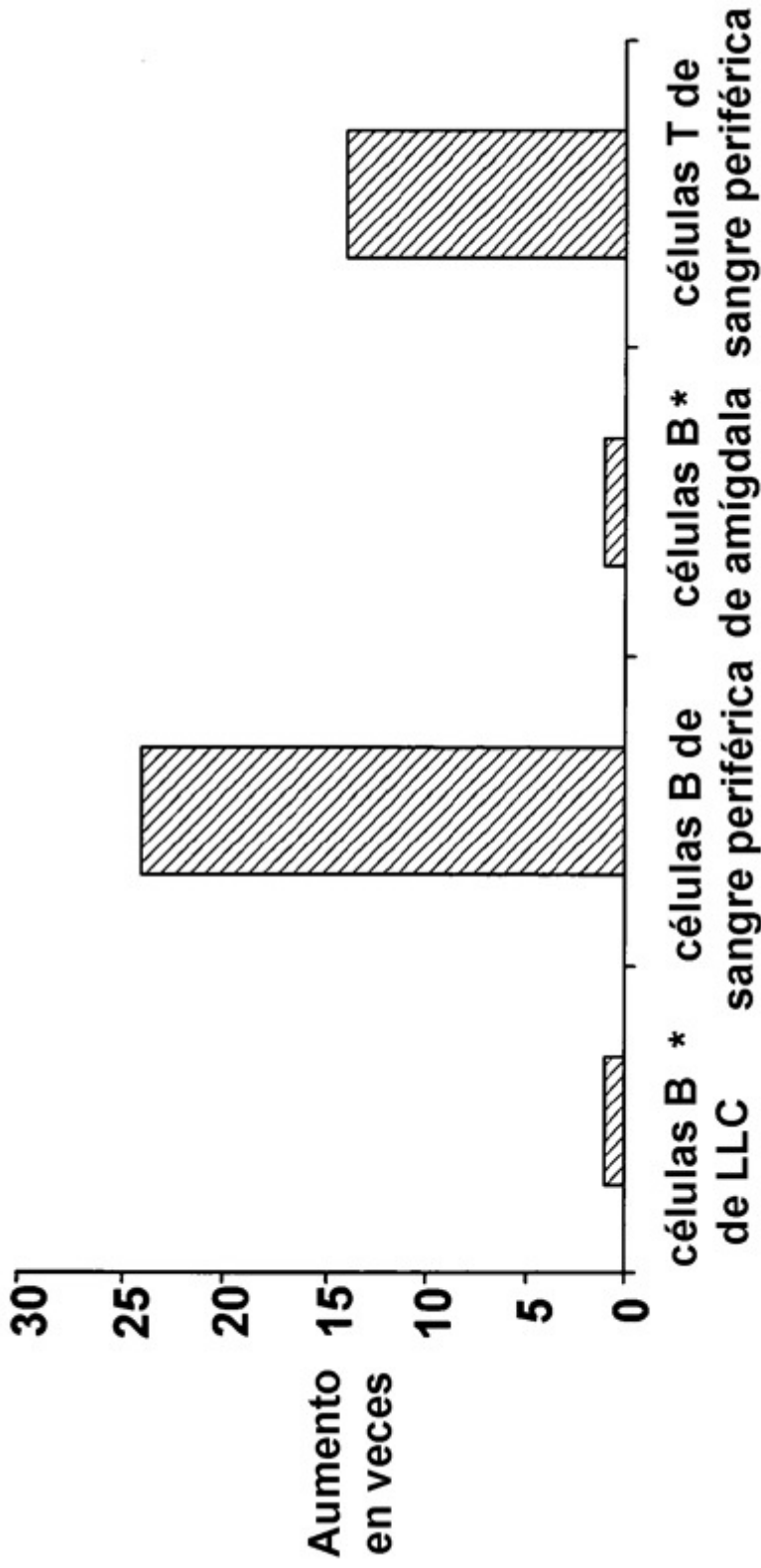


Fig. 4

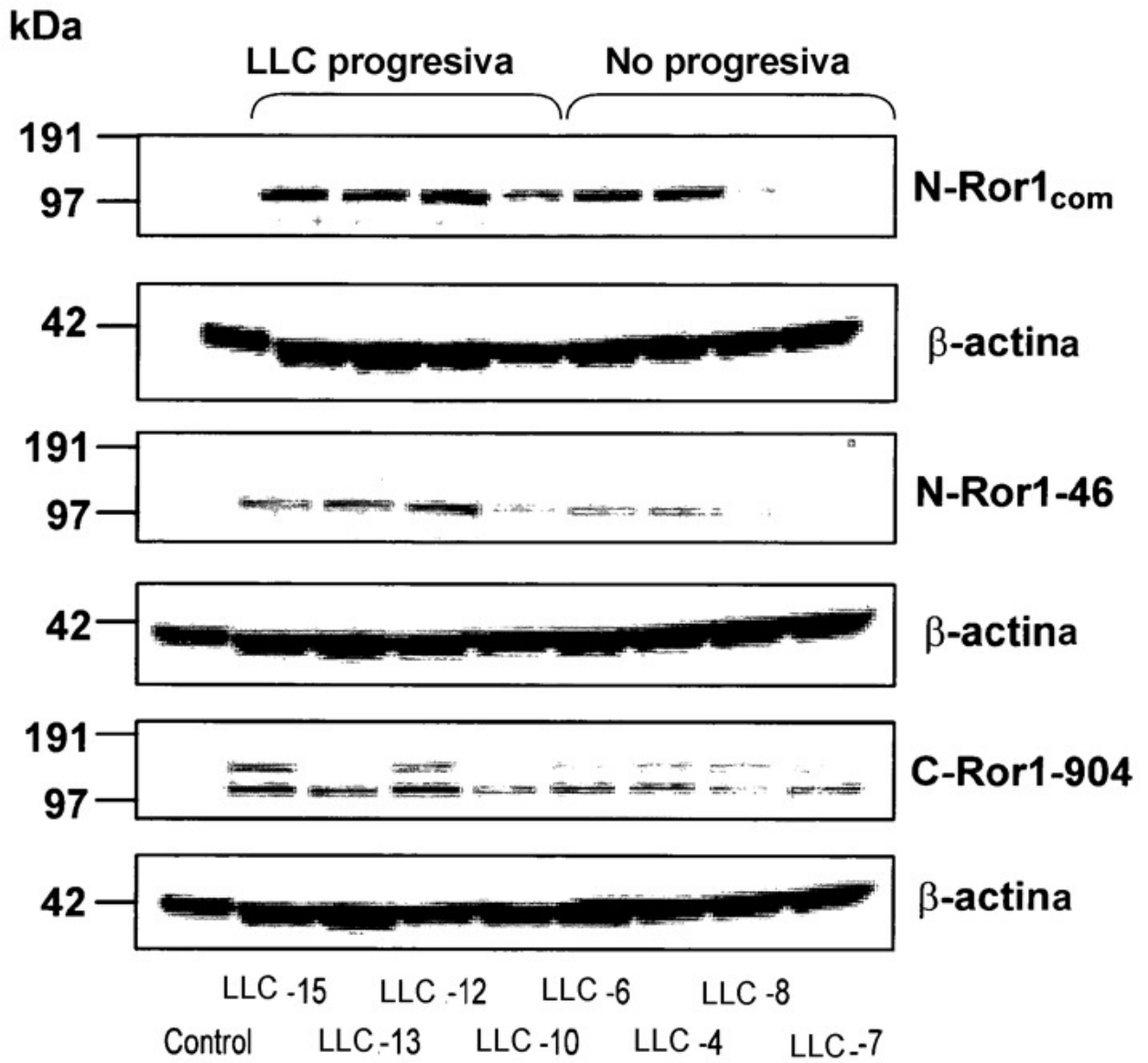


Fig. 5

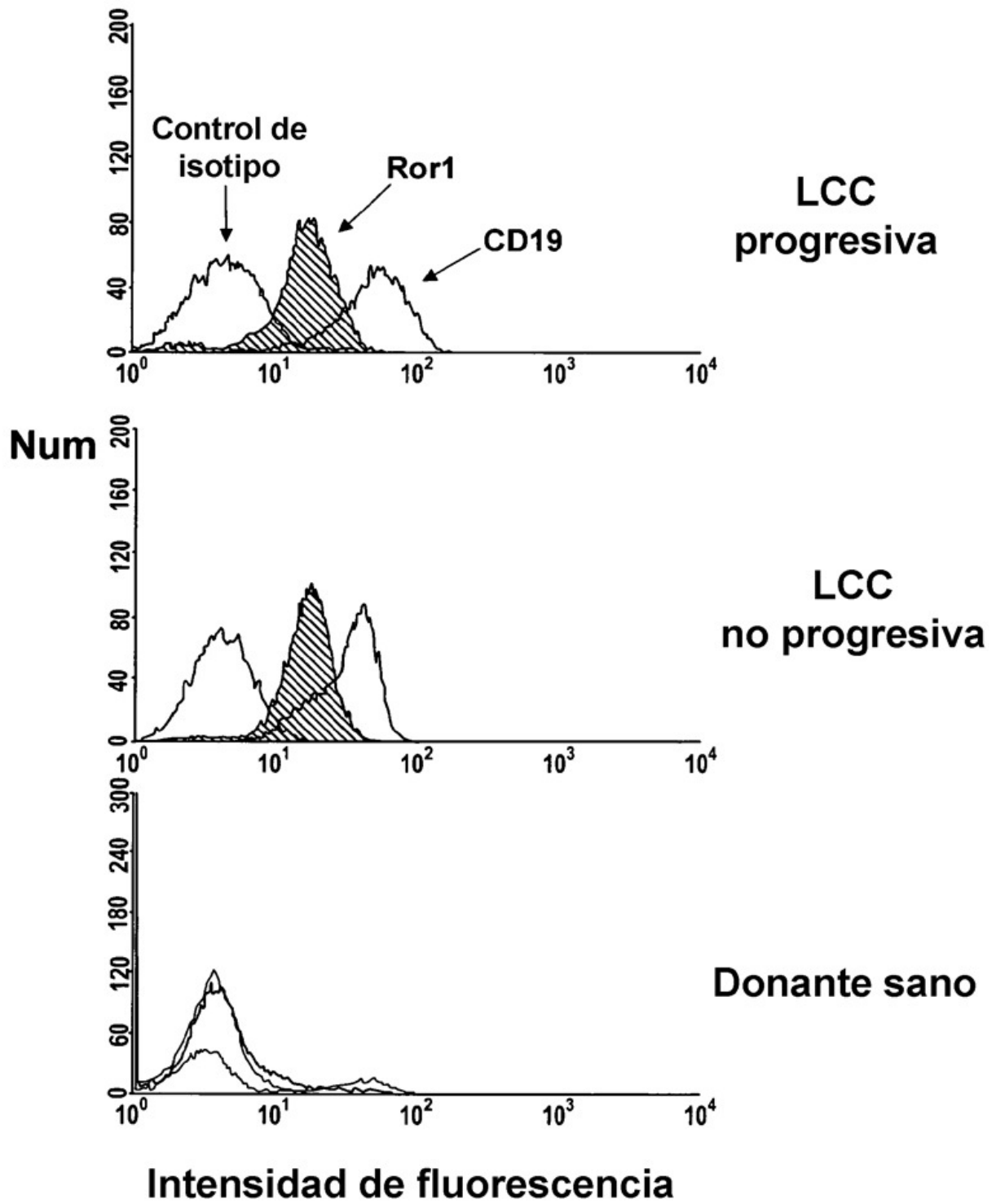


Fig. 6

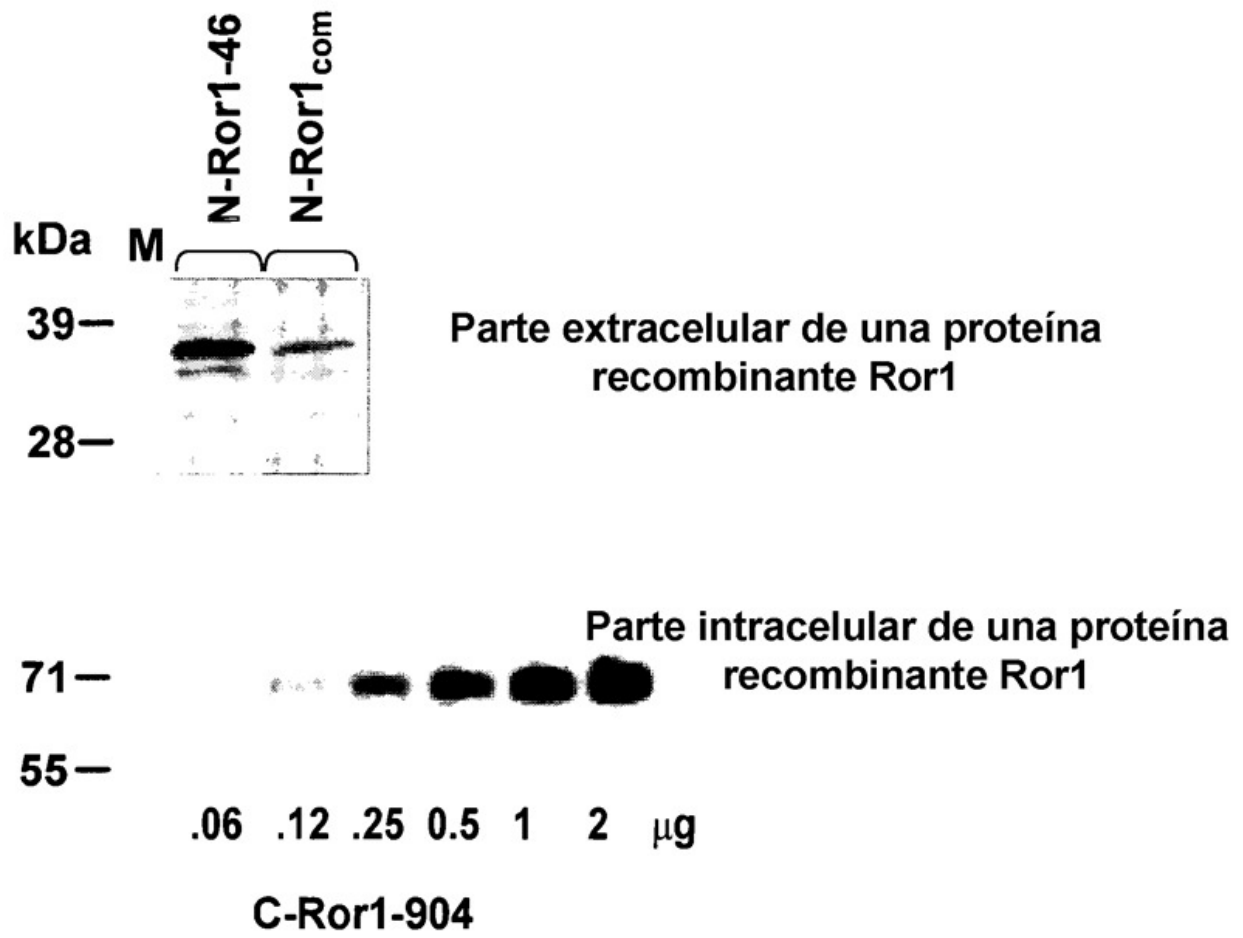


Fig. 7



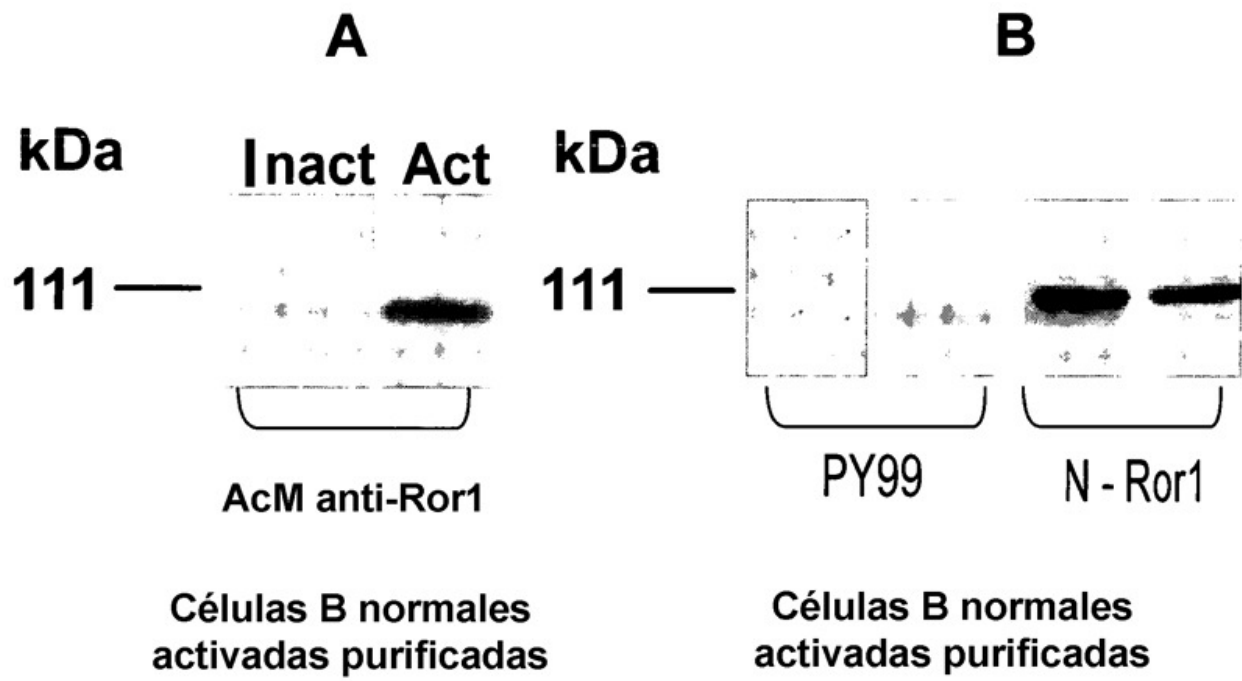
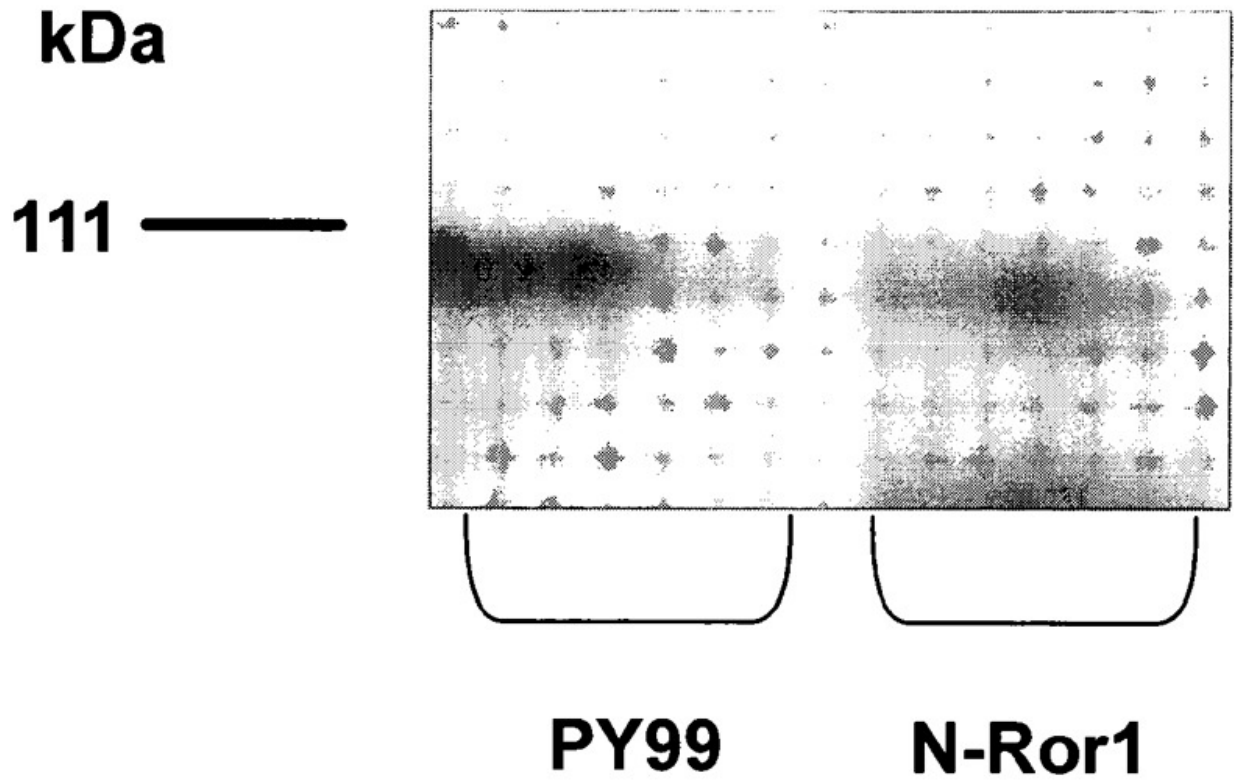


Fig. 8



**Fig. 9**

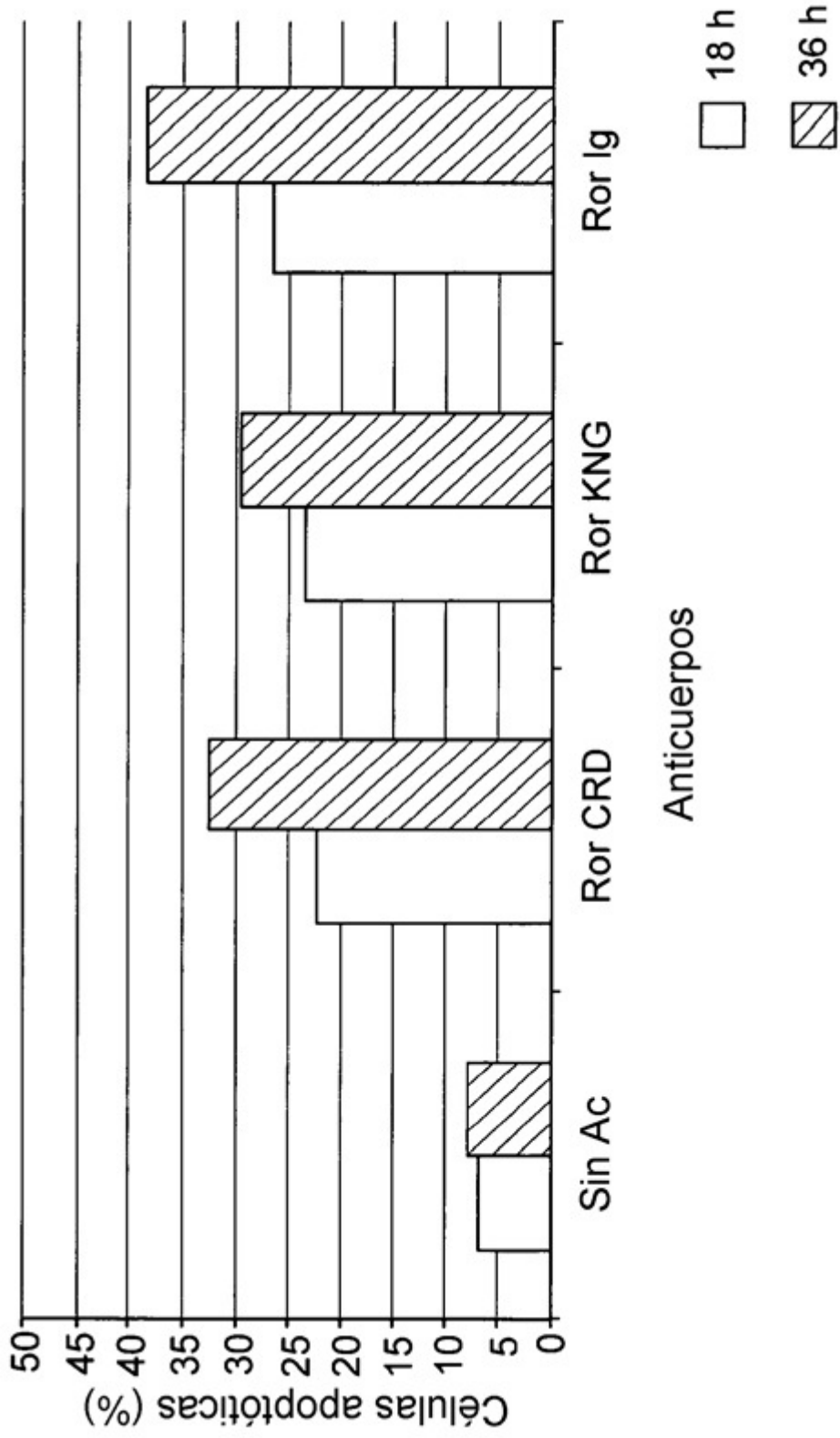


Fig. 10

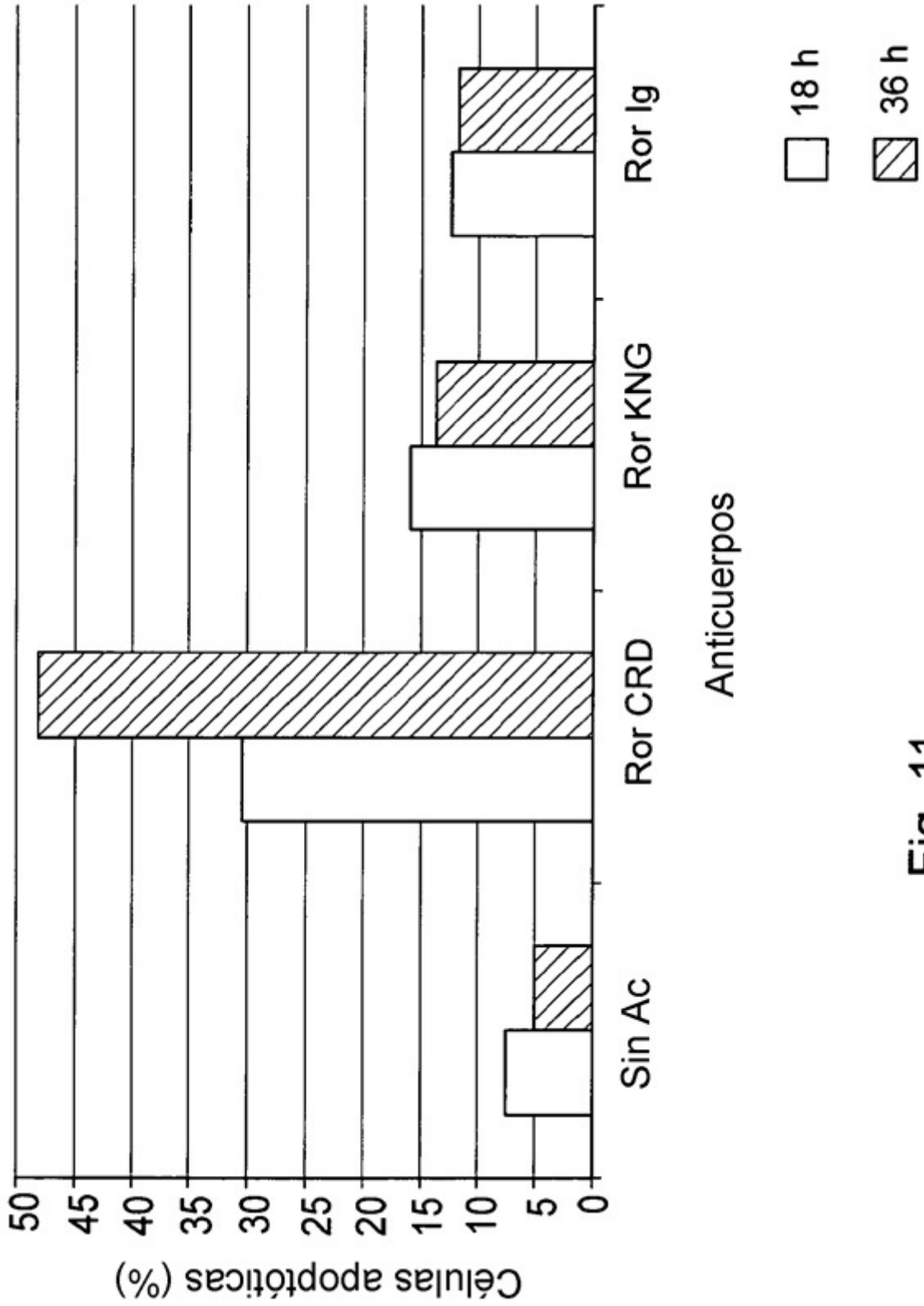


Fig. 11

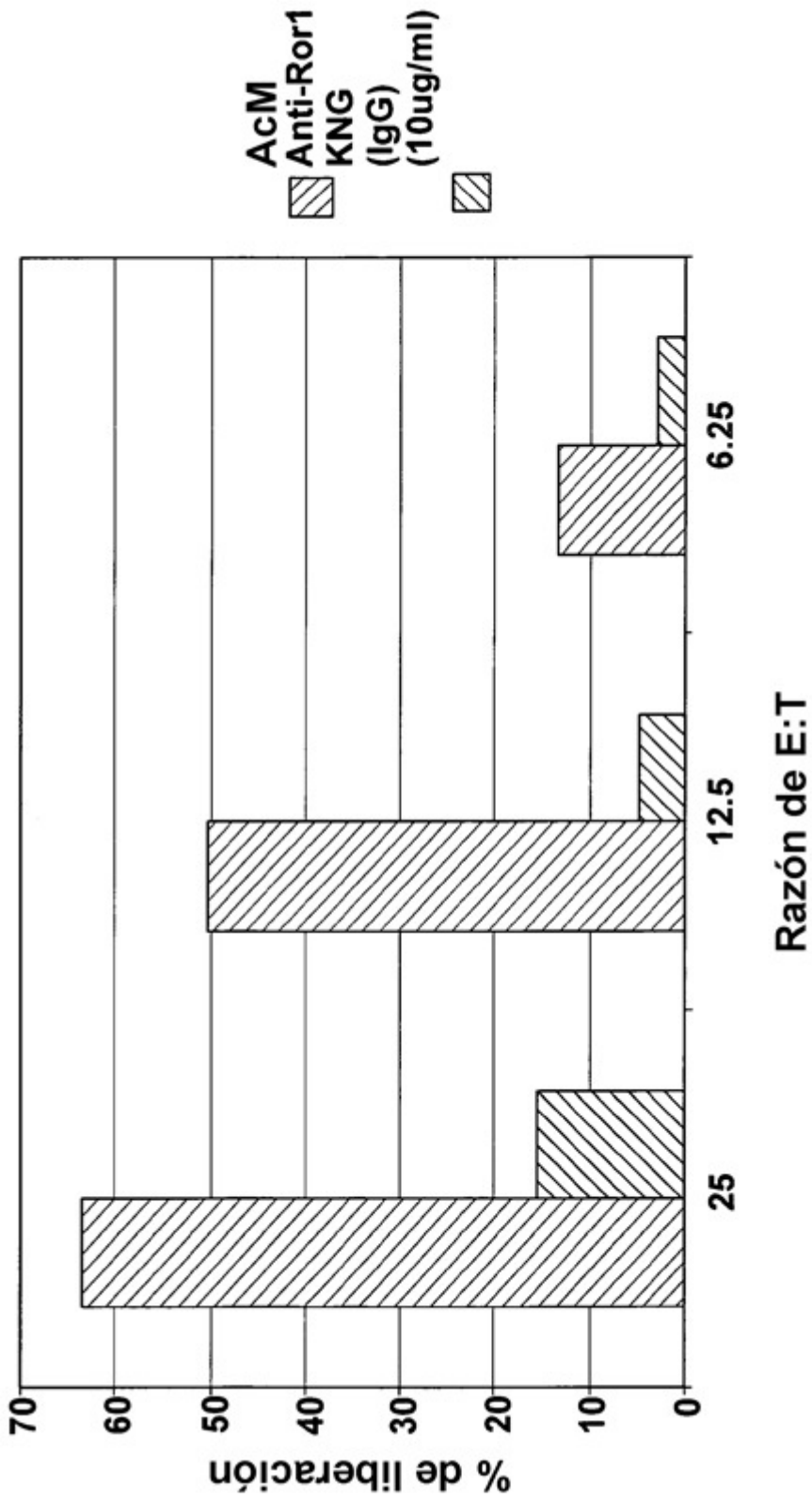


Fig. 12

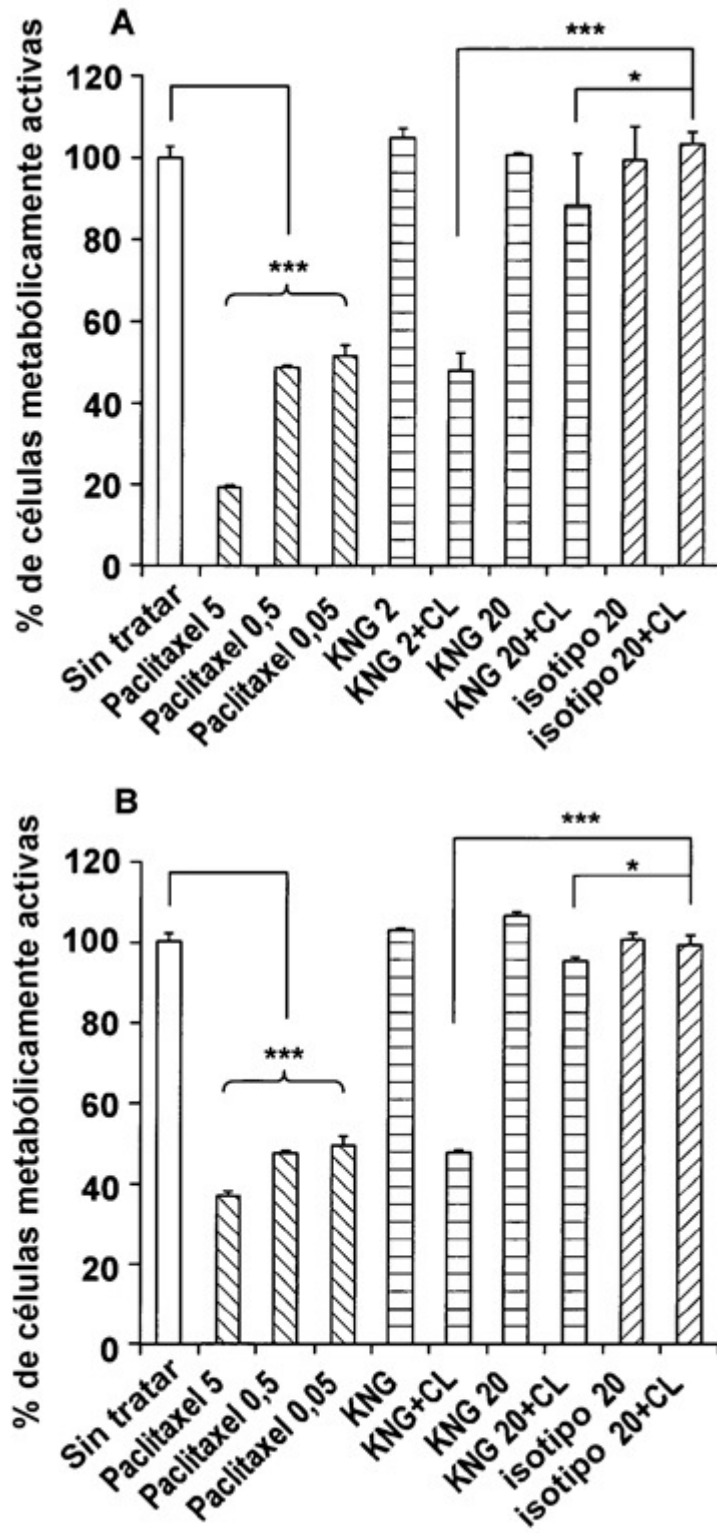


Fig. 13

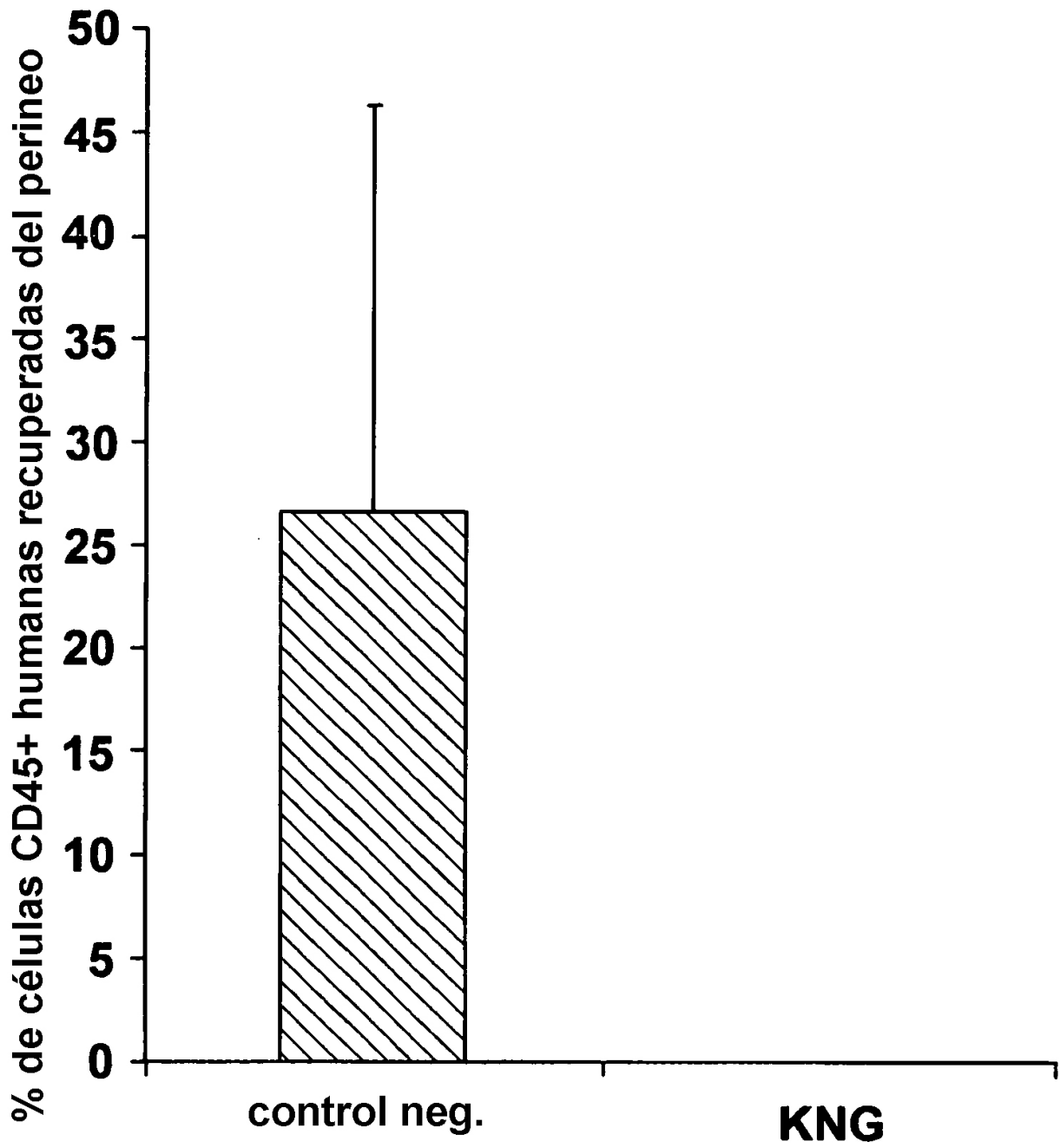


Fig. 14

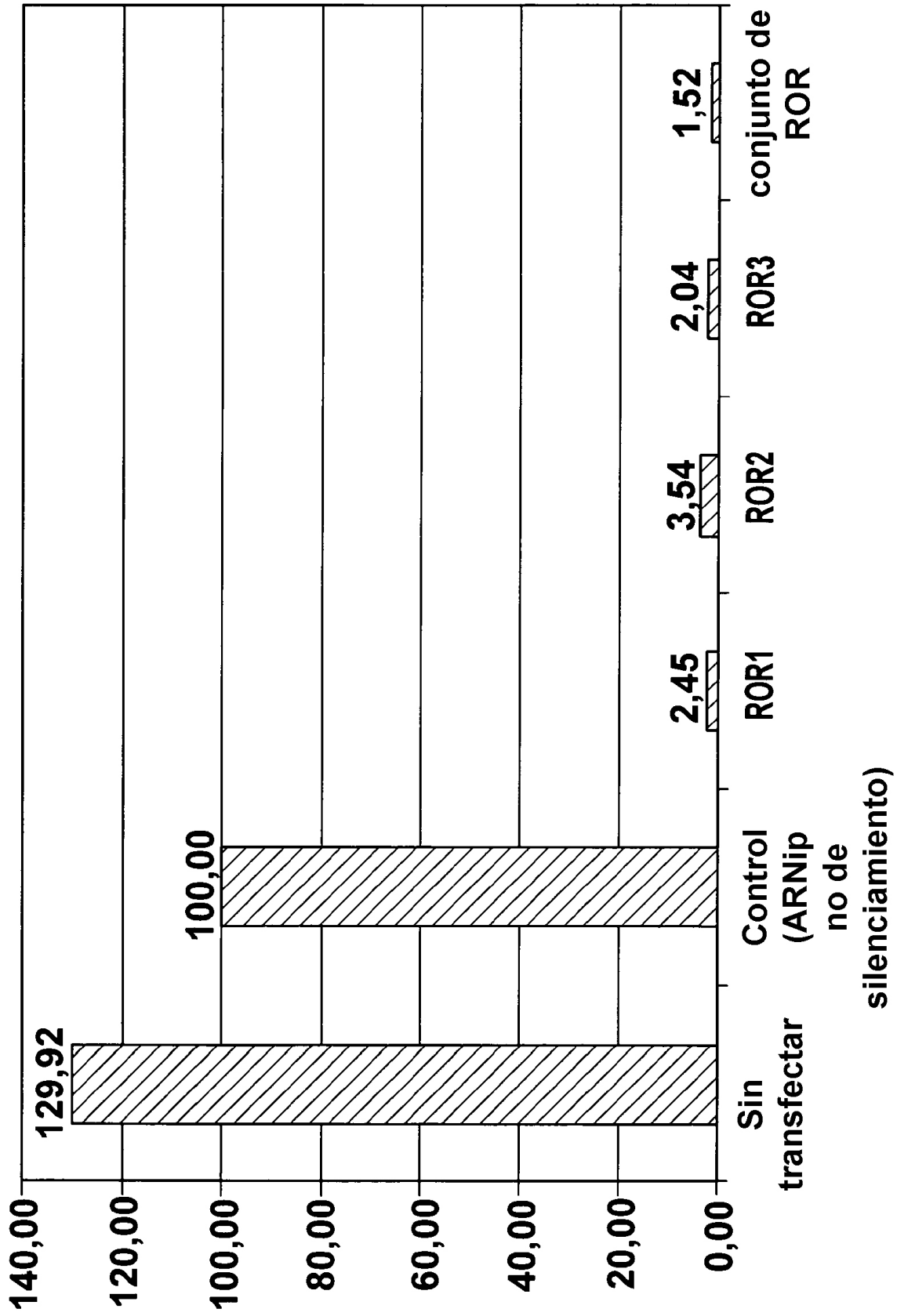


Fig. 15



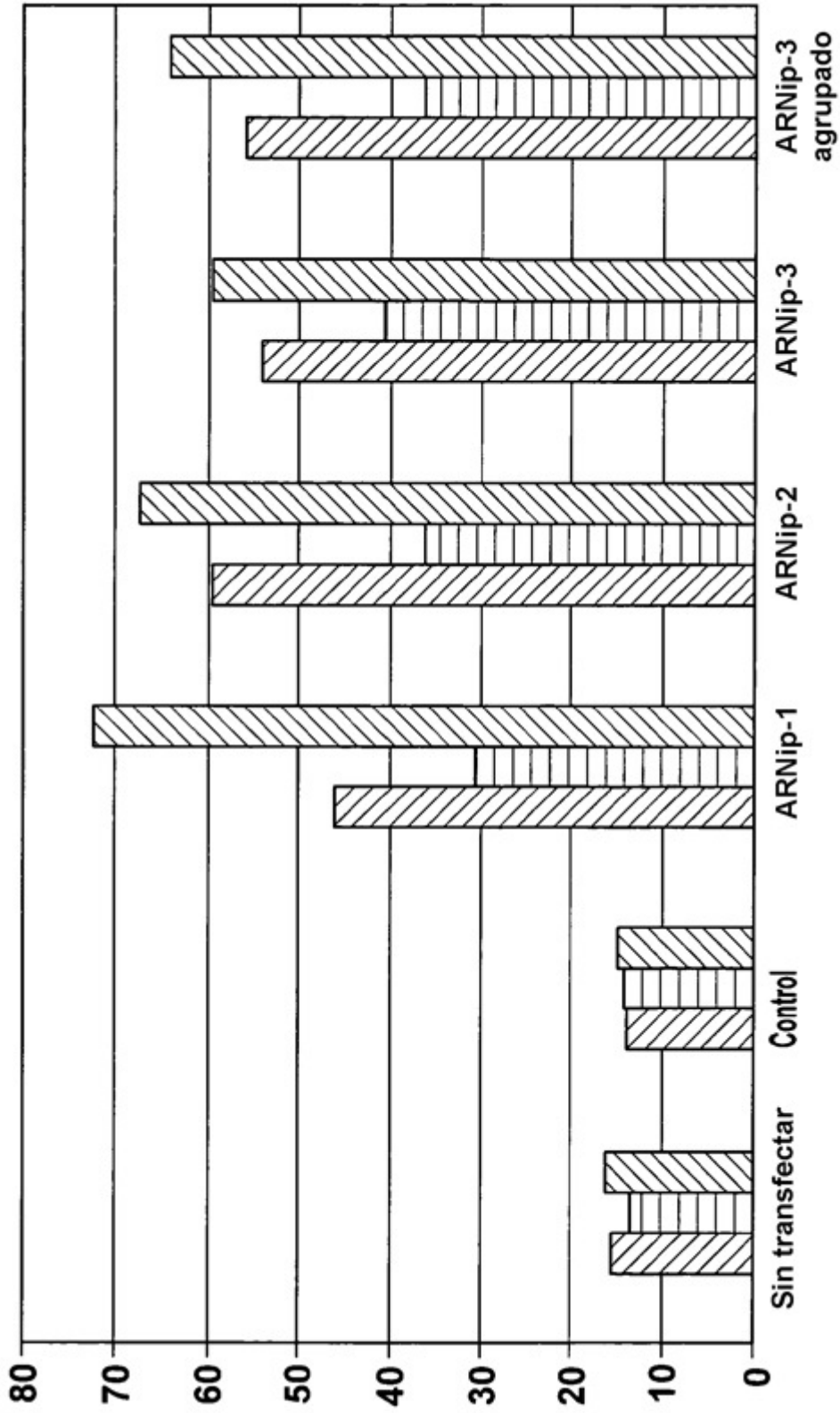


Fig. 16

**VL (kappa)**

ATGGAAATTGAGATCAGCCAGACTCCAGCACTCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC  
 CATGAOCTGCAAGTCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAAGAT  
 CCTCCOCCAAAACCTGGATTTATCTCACATCCAACC TGGCTTCTGGAGTCCCTGCTOGCTTC  
 AGTGGCAGTGGGCTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGC  
 TGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAAACCCGTACAGTTCGGAGGGGGGACCAGGC  
 TGGAGCTAAAA

atggaaattgagatcaccagactccagcaactcatgtctgcatctccaggggagaaggtc  
 M E I E I T Q T P A L M S A S P G E K V  
 accatgacctgcagtccagctcaagtgtaagttacatgtactggtaccagcagaagcca  
 T M T C S A S S S V S Y M Y W Y Q Q K P  
 agatcctcccccaaacctggatttatctcacatccaacctggcttctggagctcctgct  
 R S S P K P W I Y L T S N L A S G V P A  
 cgcttcagtggcagtggtctgggacctctactctcacaaatcagcagcatggaggct  
 R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A  
 gaagatgctgccacttattactgccagcagtgagtagtaacctgacaagtcggaggg  
 E D A A T Y C Q Q W S S N P Y T F G G  
 gggaccaggctggagctaaaa  
 G T R L E L K

MEIEITQT PALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLNASG  
 VPARFSGSGSGLTSSMEAE DAATY CQQWSSNPYTFGGGTRLELK

**VH (VH2)**

GAGGTCAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG  
 ATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATGCAGTGGGTGAAG  
 CAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAATGGTGGT  
 ACTAGCTACAACCAGAAGTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTCC  
 AGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTAC  
 TGTGCTCTACAGGGGTTTGTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCCACTCACGGTCTCCTCA

gaggtcaagctgcagcagtcaggaacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagata  
 E V K L Q Q S G P E L V K P G A S V K I  
 tctgcaagacttctggatacacattcactgaatacaccatgcactgggtgaagcagagc  
 S C K T S G Y T F T E Y T M H W V K Q S  
 catggaagagccttgagtggattggaggtattaatcctaacaatggtggtactagctac  
 H G K S L E W I G G I N P N N G G T S Y  
 aaccagaagttcaagggcaaggocacattgactgtagacaagtcctccagcacagcctac  
 N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y  
 atggagctccgcagcctgacatctgaggattctgcagctctattactgtgctctacagggg  
 M E L R S L T S E D S A V Y Y C A L Q G  
 tttgcttactggggccaagggactccactcacggtctcctca  
 F A Y W G Q G T P L T V S S

EVKLQQSGPELVKPGASVKI SCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNGG  
 TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCALQGFAYWQGTP LTVSS

**Fig. 17**

**VL (kappa)**

ATGGAAGTTCTGATCAOCCAGACTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAG  
 TCTCACTTGTCGGGCAAGTCAGGACATTTGGTAGTAGCTTAACTGGCTTCAGCAGGAACCAG  
 ATGGAACTATTAACGOC TGATCTACGCCACATCCAGTTTAGATTC TGGTGTCCCCAAAAGG  
 TTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGA  
 TTTTGTAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCTCCGTACAGGTTCCGGAGGGGGACCA  
 AACTGGAGCTCAA

atggaagtctgatcaoccagactccatcctccttattctgcctctctgggagaaagagtc  
 M E V L I T Q T P S S L S A S L G E R V  
 agtctcacttgctgggcaagt caggacattggtagtagcttaaactggcttcagcaggaa  
 S L T C R A S Q D I G S S L N W L Q Q E  
 ccagatggaactattaacgcctgatctacgccacatccagtttagattctgggtgtcccc  
 P D G T I K R L I Y A T S S L D S G V P  
 aaaaggttcagtggcagtaggtctgggtcagattattctctcaccatcagcagccttgag  
 K R F S G S R S G S D Y S L T I S S L E  
 tctgaagat tttgtagactattactgtctacaatatgctagttctccgtaca cgttcogga  
 S E D F V D Y Y C L Q Y A S S P Y T F G  
 ggggggaccaaactggagctcaaa  
 G G T K L E L K

MEVLITQT PSSLASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDS  
 GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSELEDFVDYYCLQYASSPYTFGGGTKLELK

**VH (VH2)**

**GAGGTCAAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAG**  
 ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTACACGATGCACTGGGTAAAA  
 CAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCAGTGGATAT  
 ACTGAGTACAATCAGAAGTTC AAGGACAAGACCACATTGACTGCAGACAAATCCTCC  
 AGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGGGGACTCTGCGGTCTATTAC  
 TGTGCAAGAAGGGTACTATGTTACGACGCGGAGACTACTGGGGCCAAGGCACTATA  
 CTCACGGTCTCCGCA

gaggtcaagctgcaggagtctggagctgaaactggcaagacctggggcctcagtgaagatg  
 E V K L Q E S G A E L A R P G A S V K M  
 tctgcaaggtctctggctacacctttactagctacacgatgcaactgggtaaacagagg  
 S C K A S G Y T F T S Y T M H W V K Q R  
 cctggacagggctctggaaatggattggatacattaatcctagcagtgatatactgagtac  
 P G Q G L E W I G Y I N P S S G Y T E Y  
 aatcagaagttcaaggacaagaccacattgactgcagacaaatcctccagcacagcctac  
 N Q K F K D K T T L T A D K S S S T A Y  
 atgcaactgagcagcctgacatctggggactctgcggtctattactgtgcaagaaggta  
 M Q L S S L T S G D S A V Y Y C A R R V  
 ctatggttacgacgaggagactactggggccaaggcactatactca cgggtctccgca  
 L W L R R G D Y W G Q G T I L T V S A

EVKLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPCQGLEWIGYINPSSGY  
 TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSGDSAVYYCARRVLWLRRGDYWGQGTI  
 LTVSA

Fig. 18

**VL (Kappa)**

ATGGATGTTGTGGTGACTcCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCA  
 CCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAAC  
 CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGATCCAACCTAGAATCTGG  
 GGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTG  
 TGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTCCGGAG  
 GGGGACCAGGCTGGAGCTAAAA

atggatgttgtggtgactccagtctcctgcttccttagctgtatctctggggcagagggc  
 M D V V V T P V S C F L S C I S G A E G  
 caccatctcatacagggccagcaaaagtgtcagtacatctggctatagttatgcaactg  
 H H L I Q G Q Q K C Q Y I W L - L Y A L  
 gaaccaacagaaaccaggaagccaccagactcctcatctatcttgatccaacctaga  
 E P T E T R T A T Q T P H L S C I Q P R  
 atctggggtccctgccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcaccctcaacat  
 I W G P C Q V Q W Q W V W D R L H P Q H  
 ccatectgtggaggaggaggatgctgcaacctattactgtcagcacattagggagcttac  
 P S C G G G G C C N L L L S A H - G A Y  
 acgttcggaggggggaccaggctggagctaaaa  
 T F G G G T R L E L K

MDVVVTPVSCFLSCLSGAEGHHLIQGQKCOYIWL-LYALEPTETRTATQTPHLSCIQPR  
 IWGPCQVQWQVWDRLLHPQHPSGGGGCCNLLLSAH-GAYTFGGGTRLELK

**VH (VH1)**

GAGGTCAAACCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
 CTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG  
 GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAG  
 AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAAATCCAGCACAGCCTACATGGAGCT  
 CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATGGAAGATCTACTATG  
 GTAACCTACGAGGACTACTGGGGCCAAGGCATCCTCTCACTGTCTCCTCA

gaggtcaaactgcaggagtctggacctgagctggtaaagcctggggcttcagtgaagatg  
 E V K L Q E S G P E L V K P G A S V K M  
 tctgcaaggcttctggatacacattcactagctatggtatgcaactgggtgaagcagaag  
 S C K A S G Y T F T S Y V M H W V K Q K  
 cctgggcagggccttgagtggattggatattaatccttacaatgatggactaagtac  
 P G Q G L E W I G Y I N P Y N D G T K Y  
 aatgagaagtcaaaggcaaggccacactgacttcagacaaaatcctccagcacagcctac  
 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y  
 atggagctcagcagcctgacctctgaggactctgcggtctatctactgtgcaagatggaag  
 M E L S S L T S E D S A V Y Y C A R W K  
 atctactatggtaactacgaggactactggggccaaggcactcctctcactgtctcctca  
 I Y Y G N Y E D Y W G Q G T P L T V S S

EVKLQESGPPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTY  
 NEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSLTSEDSAVYYCARWKIYYGNVEDYWGQGTPLTVSS

**Fig. 19**

Tinción de superficie celular de PBMC de un donante sano usando los seis anticuerpos monoclonales frente a Ror1

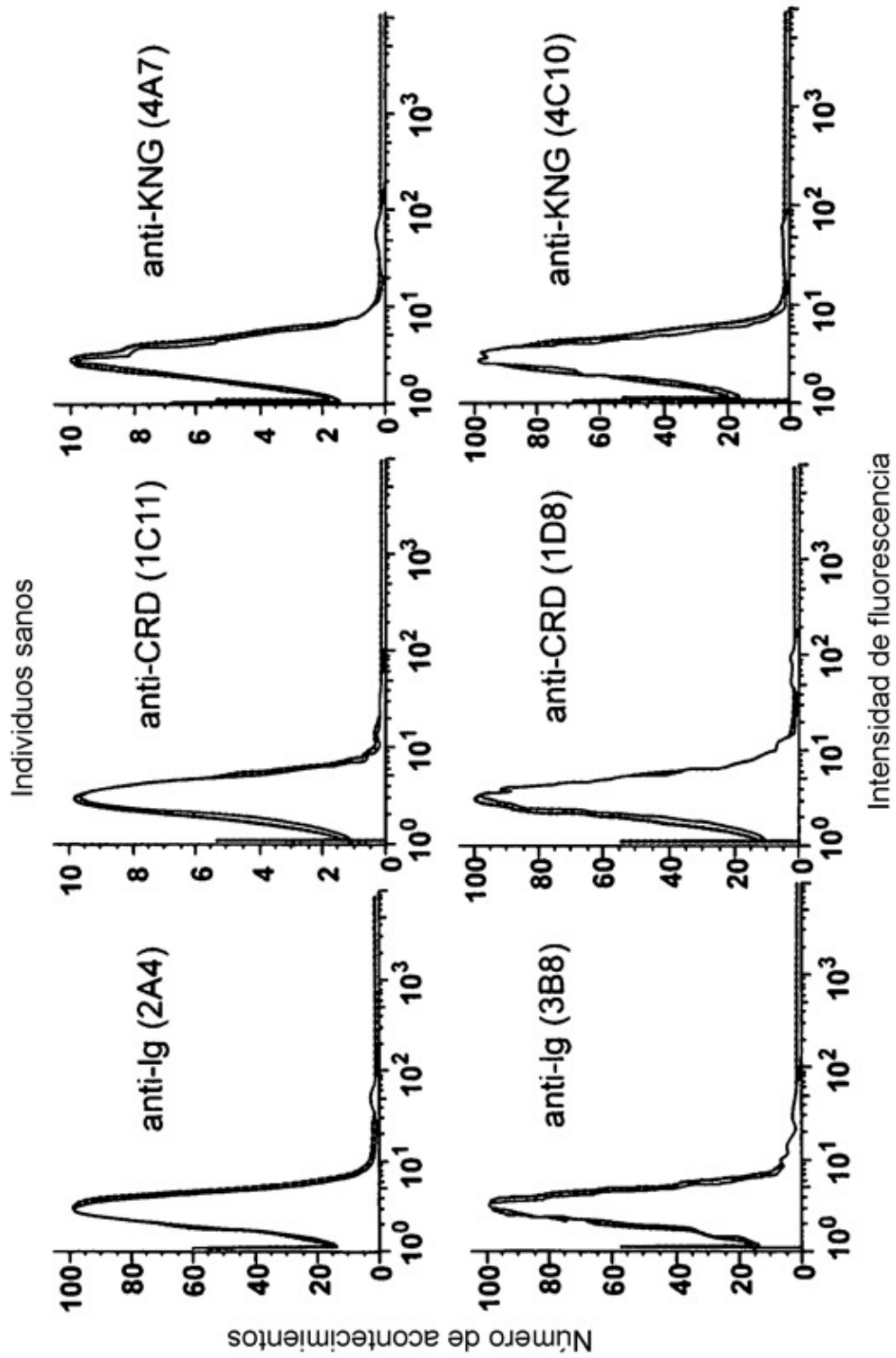


Fig. 20

Tinción de superficie celular de linfocitos de LLC de un donante sano usando los seis anticuerpos monoclonales frente a Ror1

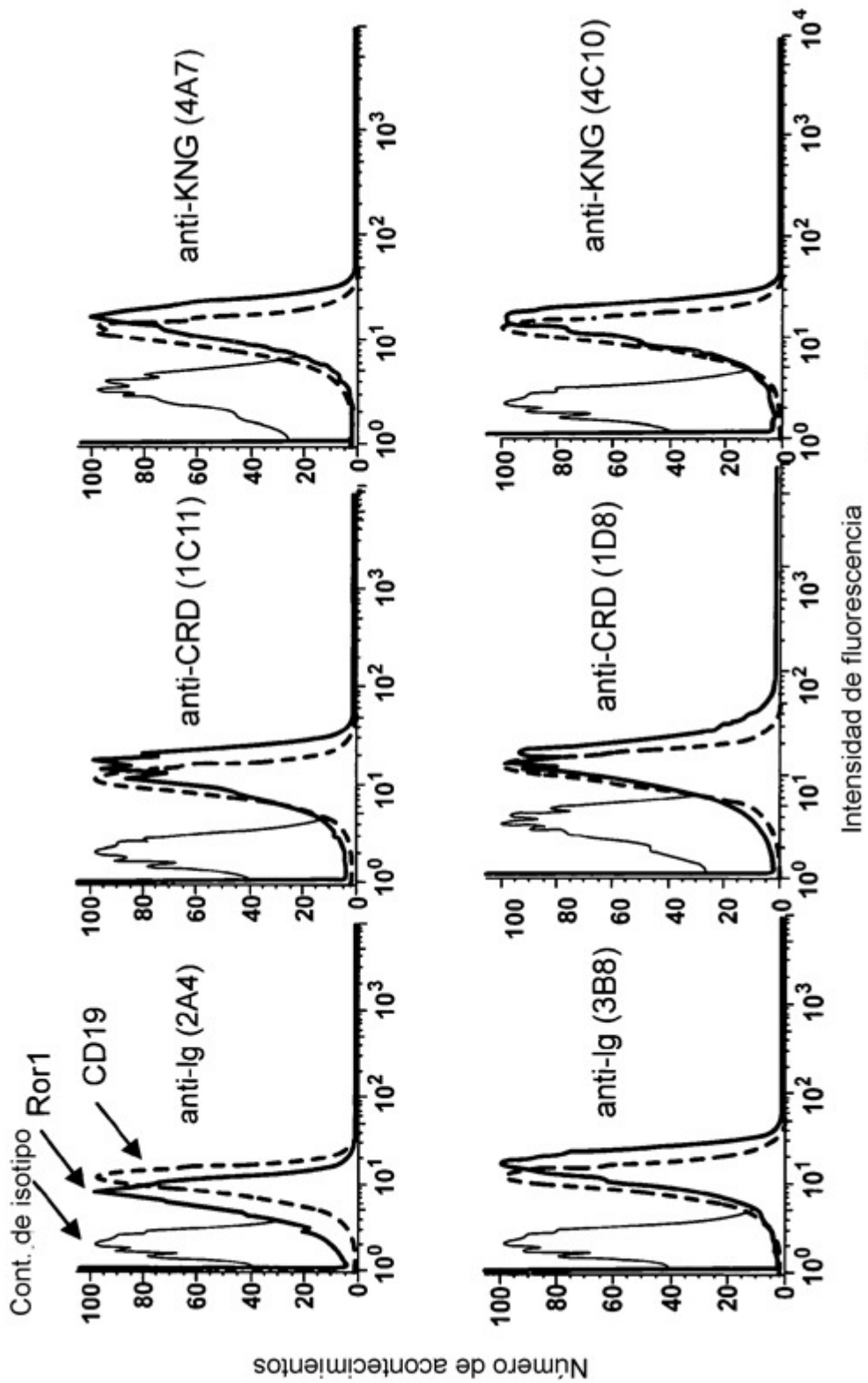
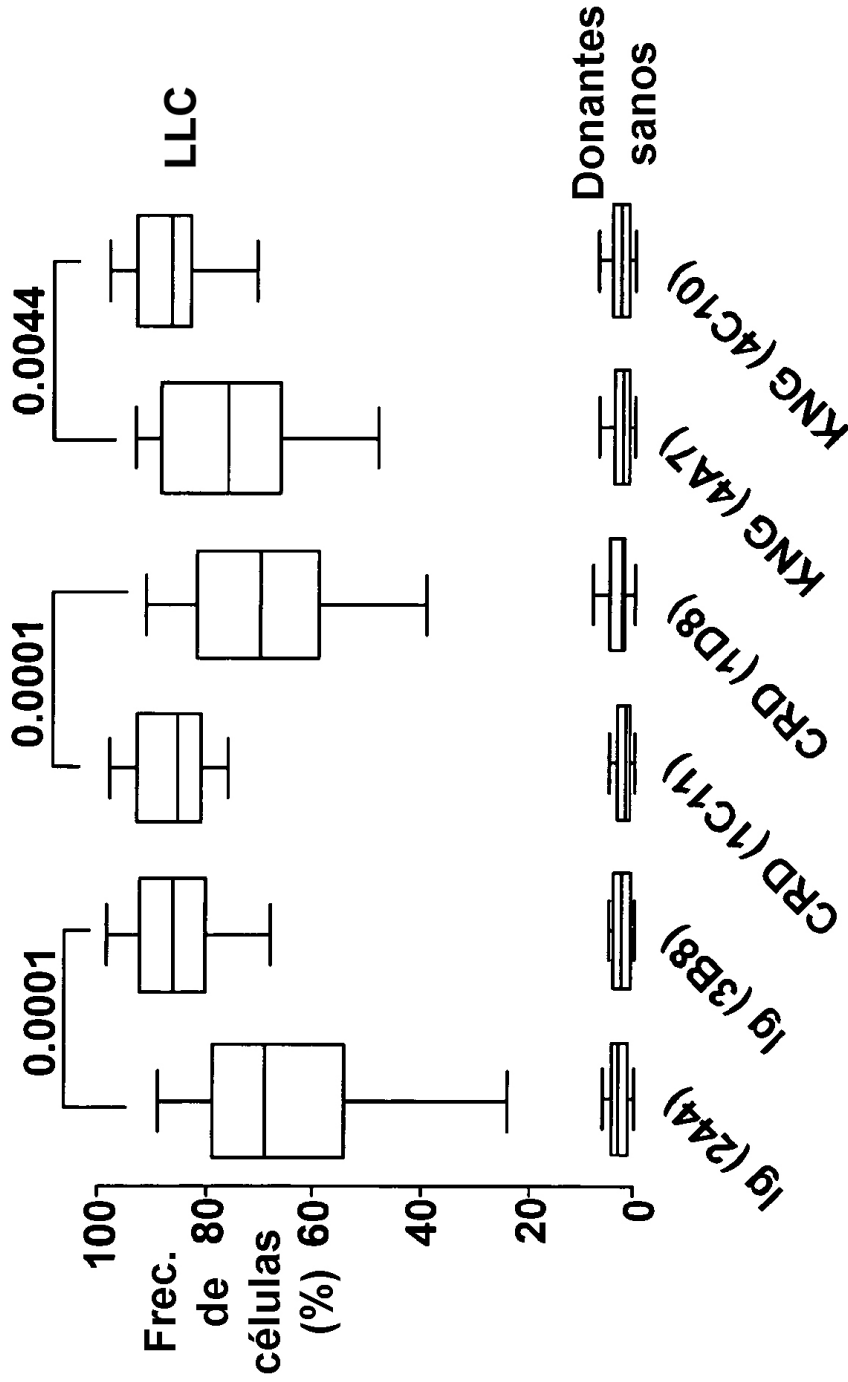


Fig. 21

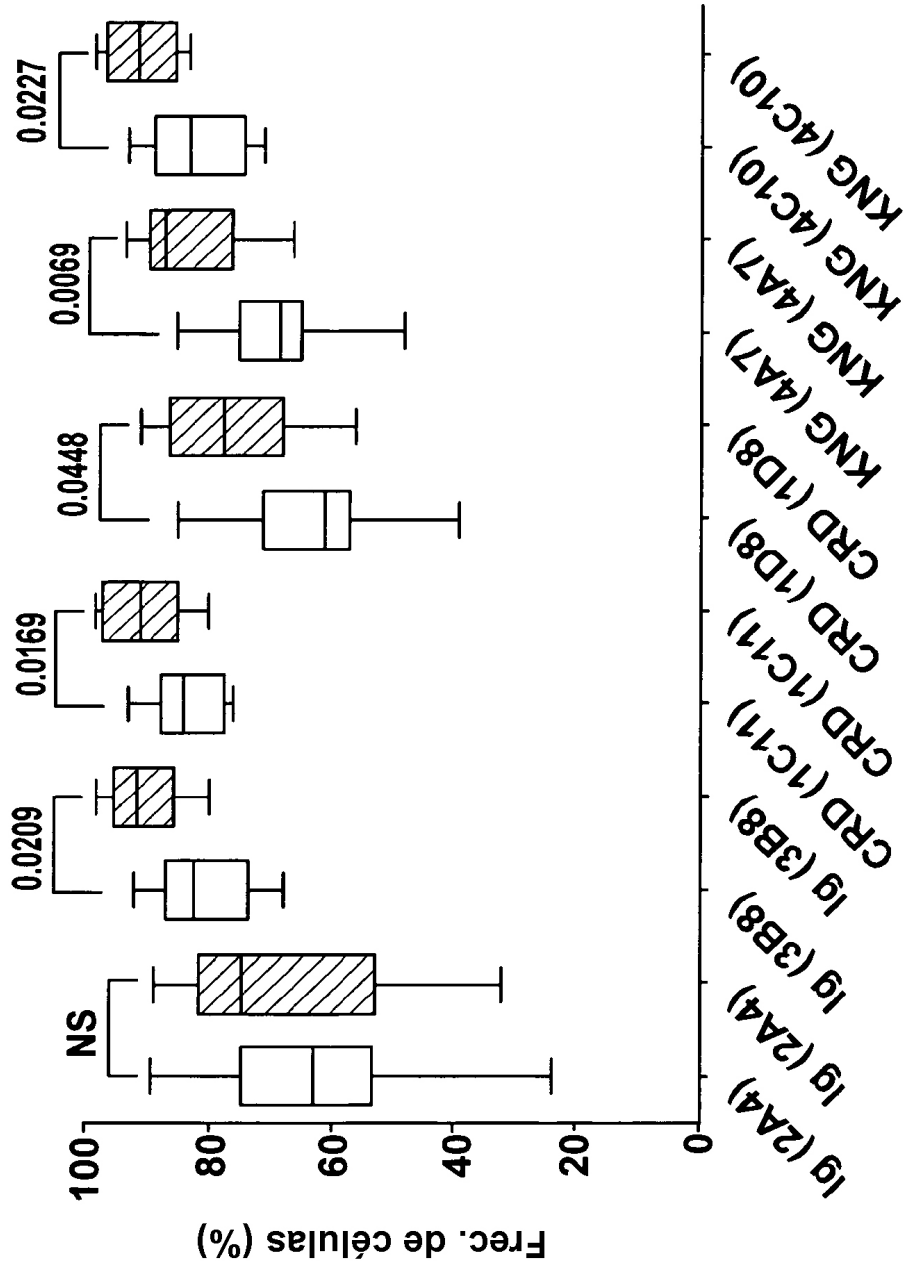
Frecuencia de células teñidas por los diferentes anticuerpos monoclonales frente a Ror1 en pacientes con LLC (n=20) y donantes sanos (n=10)



Anticuerpos monoclonales

Fig, 22

Frecuencia de células teñidas por los diferentes anticuerpos monoclonales en pacientes con enfermedad no progresiva (□) y progresiva (▨)

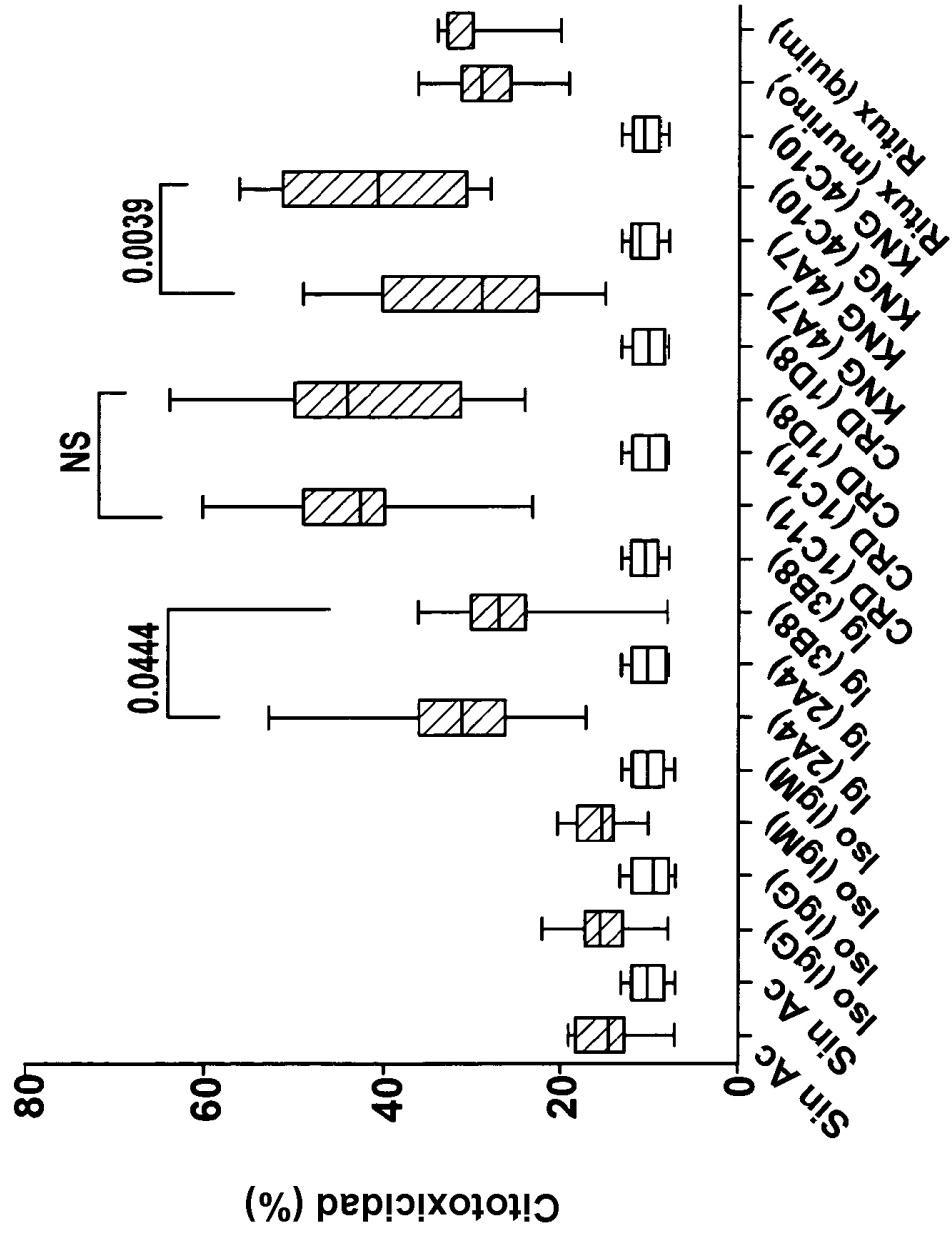


Anticuerpos monoclonales

Fig. 23



Apoptosis (anexina V) inducida por los seis anticuerpos monoclonales frente a Ror1 en pacientes con LLC (■) (n=20) y donantes sanos (□) (n=8). Se usaron Rituximab murino y quimérico para comparación



Anticuerpos monoclonales

Fig. 24

## Los seis anticuerpos monoclonales frente a Ror1 indujeron escisión de PARP en células de LLC

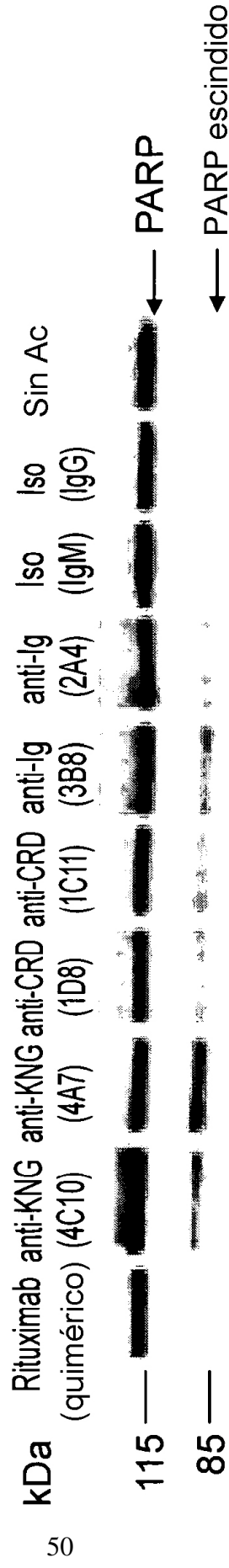


Fig. 25