

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 862**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2011 PCT/EP2011/072490**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12076727**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2011 E 11804984 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2649098**

54 Título: **Anticuerpos contra ROR1 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

10.12.2010 GB 201020995
17.06.2011 WO PCT/EP2011/003017

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TEIGE, INGRID

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones :

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

ES 2 653 862 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 y usos de los mismos

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que inhiben ROR1 y que pueden inducir muerte celular mediante la unión específica de ROR1, a dominios de los mismos o a moléculas de nucleótidos que codifican para ROR1.

10 La leucemia linfocítica crónica (CLL) es un cáncer de los glóbulos blancos que se caracteriza por una proliferación neoplásica anómala de linfocitos B (células B). Las células B de CLL difieren de células B normales en su estadio de activación y maduración y se derivan, en particular, de células B con experiencia con antígenos con diferentes mutaciones génicas de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (*IgVH*) (Chiorazzi *N et al.*, *N Engl J Med* 2005; 352:804-15). Los pacientes con CLL 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).

15 Estudios de perfiles de expresión génica globales han revelado perfiles de expresión parcialmente distinguibles pero en general solapantes en células B de leucemia mutadas y no mutadas, lo que sugiere 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).

20 Estudios de perfiles de expresión génica han demostrado un aumento de 43,8 veces del receptor tirosina cinasa (RTK) huérfano *ROR1* en células de CLL (Klein U *et al.*, *J Exp Med* 2001; 194:1625-38). *Ror1* es un miembro de la familia de RTK de receptores huérfanos relacionados con cinasa específica del 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).

25 Los receptores Ror son receptores de superficie celular que participan en la transducción de señales, la interacción célula-célula, la regulación de la proliferación celular, diferenciación, metabolismo celular y supervivencia (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 desde el punto de vista evolutivo entre diferentes especies, por ejemplo, ser humano, ratón, *Drosophila* y *C. elegans*.

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

35 *ROR1* está ubicado en la región cromosómica 1 p31.3 (<http://www.ensembl.org>), una región en la que no se observan con frecuencia aberraciones cromosómicas en neoplasias malignas hematológicas (figura 2). *ROR1* humano se expresa en el corazón, pulmón y riñón, pero menos en la placenta, páncreas y músculo esquelético (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 gen de *Ror1* truncado (t-*Ror1*) en el sistema nervioso central humano fetal y de adulto, en leucemias humanas, líneas celulares de linfoma y en una variedad de cánceres humanos derivados de neuroectodermo (Reddy UR *et al.*, *Oncogene* 1996; 13:1555-9). También se ha descrito un transcrito más corto a partir de los exones 1-7 que incluye una parte corta del intrón 7 con una longitud predicha de 393 aminoácidos y un peso molecular de 44 kDa (ID de Ensembl; ENSG00000185483).

40 Se ha descrito la expresión de ROR-1 en células cancerosas para CLL (Baskar *et al* (2008) *Clin Cancer Res*, 14, págs. 396-404; Choudhury *et al* (2010) *B.J. Haem*, 151, págs. 327-335; y Hudecek *et al* (2010) *Blood*, publicación en línea DOI: 10.1182/blood-2010-05-283309); MCL (Hudecek (2010)); B-ALL (Hudecek (2010) y Shabani *et al* (2008) *Leuk & Lymph*, 49 págs. 1360-1367), otras leucemias y linfomas (Fakuda *et al* (2008) *PNAS*, 105, págs. 3047-3052; y Barna *et al* (2010) *Hematol Oncol*, publicación en línea DOI: 10-1002 / hon.948) y cánceres sólidos (renal y de colon) (Katoh & Kotoh (2005) *Oncol Rep* 14, págs. 1381-4).

55 Rabbani, H. *et al.* (resumen n.º 916, 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2010) dan a conocer anticuerpos monoclonales de ratón producidos contra ROR1. Los seis anticuerpos indujeron apoptosis de células de CLL humanas. Se indujo una mayor frecuencia de células de CLL apoptóticas mediante anticuerpos contra la región de CRD así como contra el dominio Kringle de ROR1.

60 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-ROR1 que puede inducir muerte celular en una célula que expresa ROR1 tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los anticuerpos anti-ROR inducen muerte celular directamente o a través de diferentes mecanismos efectores, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP).

65 El anticuerpo puede actuar para reducir la cantidad o acción de ROR1. Por ejemplo, el anticuerpo puede actuar

directamente uniéndose a ROR1 o a una secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1. Alternativamente, el anticuerpo puede actuar impidiendo la interacción de ROR1 con moléculas con las que interactúa normalmente, por ejemplo, bloqueando receptores, secuestrando moléculas que se unen a o se asocian con ROR1, impidiendo la inserción de ROR1 o sus agentes de unión en una membrana, tal como la membrana celular.

5 El anticuerpo se une específicamente o bien a un dominio extracelular de ROR1, un dominio intracelular de ROR1 o bien a una secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1.

10 Por anticuerpo quiere decirse anticuerpos completos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Tales fragmentos se definen a continuación.

15 Los anticuerpos comprenden dos polipéptidos idénticos de M_r 50.000-70.000 (denominados "cadenas pesadas") que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, cada uno de los cuales está unido a uno de un par idéntico 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 moléculas de anticuerpo diferentes y entre cadenas ligeras individuales de moléculas de anticuerpo diferentes 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 moléculas de anticuerpo diferentes y entre cadenas ligeras individuales de moléculas de anticuerpo diferentes y estas regiones se han denominado, por tanto, "dominios constantes".

20 En general, una molécula de anticuerpo obtenida a partir de seres humanos se refiere a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren unas de otras por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Determinadas clases también tienen subclases, tales como IgG1, IgG2 y otras. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda. La referencia en el presente documento a anticuerpos incluye una referencia a todas de tales clases, subclases y tipos de especies de anticuerpos humanos.

25 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 la complementariedad (CDR) y determinan la especificidad del anticuerpo por un ligando. Los dominios variables de la cadena pesada (V_H) y la 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).

30 Los dominios variable pesado (V_H) y variable ligero (V_L) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento de antígeno, un hecho que se reconoció por primera vez por los primeros experimentos de digestión con proteasa. Se encontró una confirmación adicional mediante "humanización" de anticuerpos de roedor. Pueden fusionarse dominios variables de origen de roedor con dominios constantes de origen de ser humano de manera que el anticuerpo resultante conserva la especificidad antigénica del anticuerpo original de roedor (Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855).

35 Esa especificidad antigénica se confiere mediante dominios variables y es independiente de los dominios constantes tal como se conoce a partir de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpo, conteniendo todos ellos uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas de tipo Fab (Better *et al.*, 1988, Science, 240:1041); moléculas Fv (Skerra *et al.*, 1988, Science, 240, 1038); moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv) en las que los dominios de parejas de V_H y V_L están unidos a través de un oligopéptido flexible (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879) y anticuerpos de un único dominio (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward *et al.*, 1989 Nature 341, 544). Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpo que conservan sus sitios de unión específicos se encuentra 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 las anteriores. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, la proteína inmunogénica que se produce de manera natural, un polipéptido químicamente sintetizado que representa a 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 en aceite, dinitrofenol, etc.), adyuvantes que pueden usarse en seres humanos tales como bacilo Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*, o agentes inmunoestimulantes similares. Los ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante MPL-TDM (monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético).

65 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 proporcionan principalmente la fracción de IgG del suero inmunitario. Posteriormente, o de manera alternativa, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo del mismo, puede inmovilizarse en una columna para purificar el anticuerpo específico inmunitario mediante cromatografía de inmunoafinidad. La purificación de inmunoglobulinas se comenta, por ejemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia Pa., vol. 14, n.º 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

El término "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 sólo contienen una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un único producto génico de cadena ligera y un único producto génico de cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Por tanto, los AcM contienen un sitio de unión a antígeno que puede inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única para el mismo.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo. El anticuerpo puede ser un fragmento que incluye moléculas de scFv o moléculas de Fab.

Por "moléculas de ScFv" quiere decirse moléculas en las que los dominios de pareja de V_H y V_L están unidos a través de un oligopéptido flexible.

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

Los anticuerpos completos y los fragmentos $F(ab')_2$ son "bivalentes". Por "bivalente" quiere decirse que dichos anticuerpos y fragmentos $F(ab')_2$ tienen dos sitios de combinación con antígeno. En cambio, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes, que sólo tienen un sitio de combinación con antígeno.

Los expertos en la técnica relevante conocen bien métodos para generar, aislar y usar anticuerpos para un antígeno o epítipo deseado. Por ejemplo, puede producirse 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 usarse como antisueros en bruto o bien purificarse, por ejemplo mediante purificación por afinidad. Alternativamente puede generarse un anticuerpo de especificidad deseada usando métodos de biología molecular bien conocidos, incluyendo selección a partir de una biblioteca molecular de anticuerpos recombinantes, o injerto o intercambio de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en regiones de entramado apropiadas. Pueden seleccionarse anticuerpos humanos a partir de bibliotecas recombinantes y/o generarse injertando CDR de anticuerpos no humanos en regiones de entramado humanas usando técnicas de biología molecular bien conocidas.

Los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras con el fin de potenciar sus propiedades o bien mejorando la especificidad o afinidad de unión, o bien para portar moléculas efectoras o restos detectables. Los anticuerpos también pueden humanizarse en los que tales anticuerpos son adecuados para su administración a seres humanos sin generar una respuesta inmunitaria por parte del ser humano contra la inmunoglobulina administrada. Formas humanizadas de anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que comprenden principalmente la secuencia de una inmunoglobulina humana, y contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. La humanización puede realizarse siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.* Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.* Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR de otra fuente en un anticuerpo humano.

Los anticuerpos de la invención presentan las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L mostradas en las figuras 12 ó 15. Aspectos de la divulgación son anticuerpos que comprenden las combinaciones de secuencias de V_H y V_L de una de:

ROR1-007-B03-VH

ROR1-007-B03-VL

(figura 4)

ROR1-007-C08-VH

ROR1-007-C08-VL

(figura 5)

ROR1-007-E06-VH

ROR1-007-E06-VL

5 (figura 6)

ROR1-007-H03-VH

ROR1-007-H03-VL

(figura 7)

10

ROR1-008-A03-VH

ROR1-008-A03-VL

(figura 8)

ROR1-008-D04-VH

15

ROR1-008-D04-VL

(figura 9)

ROR1-008-G04-VH

20

ROR1-008-G04-VL

(figura 10)

ROR1-008-H06-VH

ROR1-008-H06-VL

25

(figura 11)

ROR1-009-G03-VH

ROR1-009-G03-VL

(figura 12)

30

ROR1-009-G11-VH

ROR1-009-G11-VL

(figura 13)

ROR1-010-D05-VH

35

ROR1-010-D05-VL

(figura 14)

ROR1-010-D06-VH

40

ROR1-010-D06-VL

(figura 15)

ROR1-011-F01-VH

ROR1-011-F01-VL

(figura 16)

Aspectos de la divulgación son anticuerpos que comprenden la combinación de una cadena V_H y V_L cada una a partir de un par diferente descrito en las figuras 4 a 16, a modo de ejemplo (pero sin limitarse a) V_H de la figura 4 y V_L de la figura 5.

Los anticuerpos que son aspectos de la divulgación pueden describirse alternativamente como que comprenden al menos una CDR seleccionada de las CDR mostradas en las cadenas V_H y V_L de las figuras 4 a 16, es decir al menos una de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3.

Preferiblemente, hay 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de las CDR mostradas (destacadas) en las figuras 4 a 16. Cuando hay más de una CDR presente, se prefiere que las CDR sean diferentes y se seleccionen por separado de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3.

Aspectos de la divulgación también incluyen anticuerpos que compiten contra los anticuerpos que tienen las secuencias de las figuras 4 a 16, por la unión al mismo epítipo de ROR1. Pueden detectarse anticuerpos competidores mediante cualquier método convencional incluyendo métodos basados en FACS o ELISA de detección de unión de competencia (véanse los ejemplos).

Por epítipo quiere decirse la región específica de ROR1 a la que se une el anticuerpo.

Por unión específica, o unirse específicamente a, o específico por, quiere decirse que las regiones variables de los anticuerpos de la invención reconocen y se unen a polipéptidos de la invención de manera exclusiva (es decir, pueden distinguir los polipéptido de la invención de otros polipéptidos similares a pesar de la identidad de secuencia, homología o similitud encontrada en la familia de polipéptidos).

Los anticuerpos también pueden comprender las regiones constantes (C_H y C_L) mostradas en la figura 3.

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/incorporada en la membrana celular. Un ejemplo de una molécula biológica de este tipo es un receptor que presenta una parte extracelular a la que se unen ligandos. Si la cadena de polipéptido 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 mismos puede formar un sitio de unión para un ligando.

En una realización el dominio extracelular al que se une el anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos WNISSSELNKDSYLTL.

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

La identificación de dominios diana y la producción de inhibidores biológicos frente a tales dominios se describen en más detalle en DaneshManesh (2008) Int J. Cancer 123, págs. 1190-1195.

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

Preferiblemente, el anticuerpo provoca la muerte de una célula que expresa ROR1. Por muerte celular se incluyen todas las formas de muerte celular, incluyendo, pero sin limitarse a, apoptosis, necrosis, piroptosis y muerte celular autofágica. Además, puede producirse muerte celular mediante mecanismos dependientes de $Fc\gamma R$ o mediante activación de la cascada del complemento.

La apoptosis (muerte celular programada, tipo I), es el proceso mediante el cual las células se destruyen de manera deliberada mediante desmantelamiento sistemático de su contenido que después se capta por las células circundantes.

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

La piroptosis es una ruta de muerte celular que resulta de actividad caspasa 1 que conduce a la descomposición de la membrana y al procesamiento y liberación de citocinas proinflamatorias.

La necrosis es una muerte celular prematura que se produce sin el desmantelamiento sistemático controlado de 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 después dañan y provocan la necrosis de células circundantes.

Los mecanismos mediados por FcγR incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), que da como resultado la lisis de células diana, y fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) que da como resultado la captación y posterior destrucción de las células diana por fagocitos.

5 La activación de la cascada de complemento da como resultado la alteración de la integridad de la membrana celular y posterior lisis celular, esto se conoce comúnmente como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

10 Pueden usarse anticuerpos 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 así una respuesta inmunitaria y ayudando a la recuperación. Los métodos para administrar anticuerpos terapéuticos a un paciente que lo necesita se conocen bien en la técnica.

15 Se prefiere que los anticuerpos de la invención muestren un mínimo de internalización en células. Los anticuerpos deben unirse a dianas en el exterior de la célula y el receptor no debe internalizarse en respuesta a esa unión. Los anticuerpos de la invención muestran principalmente sus efectos al no internalizarse.

20 Un experto entenderá que, durante la vida de una célula, una molécula de superficie puede internalizarse (como parte del crecimiento y la renovación y reposición natural de la membrana celular) y por tanto, como tal, también puede internalizar cualquier anticuerpo unido. Sin embargo, esta internalización fortuita de anticuerpos tiene poca relevancia para la invención ya que se produce a una tasa lenta y no se produce directa o indirectamente en respuesta a la unión.

25 Por tanto, con el fin de diferenciar entre la internalización intencionada y la renovación natural de la membrana, hay un nivel máximo de internalización que debe caracterizar los anticuerpos de interés. Este nivel máximo se expresa como porcentaje de anticuerpos administrados a un paciente o muestra *in vitro* o *in vivo* que se internalizan en una célula o células a lo largo de un periodo de tiempo dado.

30 Por ejemplo, el anticuerpo debe mostrar una internalización máxima en una célula del 10% tras 30 minutos y/o del 40% tras una hora y/o del 50% tras dos horas. Preferiblemente, la internalización es como máximo del 20% tras 30 minutos. Alternativamente, el anticuerpo debe mostrar una internalización máxima en la célula de entre el 10-50% (por ejemplo, el 10, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 45 o el 50%) tras 30 minutos, y/o entre el 40-50% (por ejemplo, el 40, el 45 o el 50%) tras una hora. En una realización el anticuerpo debe mostrar estos niveles de internalización máxima en células de CLL.

La cantidad de internalización puede medirse fácilmente usando FACS (véanse los ejemplos).

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

45 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. Estas frases también se refieren a ADN o ARN de origen genómico o sintético que pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden representar la cadena sentido o antisentido, a ácido nucleico peptídico (ANP) o a 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 es ARN, la T (timina) en las secuencias proporcionadas en el presente documento se sustituye por U (uracilo). Generalmente, pueden ensamblarse segmentos de ácido nucleico proporcionados por esta invención a partir de fragmentos del genoma y ligadores oligonucleotídicos 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 viral, o un gen eucariota.

55 Se proporcionan secuencias de nucleótidos adecuadas en las figuras 12 y 15. Aspectos de la divulgación son secuencias de nucleótidos mostradas en las figuras 4 a 16:

ROR1-007-B03-VH

ROR1-007-B03-VL

60 (figura 4)

ROR1-007-C08-VH

ROR1-007-C08-VL

(figura 5)

ROR1-007-E06-VH

ROR1-007-E06-VL

5

(figura 6)

ROR1-007-H03-VH

ROR1-007-H03-VL

10

(figura 7)

ROR1-008-A03-VH

ROR1-008-A03-VL

15

(figura 8)

ROR1-008-D04-VH

ROR1-008-D04-VL

(figura 9)

ROR1-008-G04-VH

20

ROR1-008-G04-VL

(figura 10)

ROR1-008-H06-VH

ROR1-008-H06-VL

25

(figura 11)

ROR1-009-G03-VH

ROR1-009-G03-VL

30

(figura 12)

ROR1-009-G11-VH

ROR1-009-G11-VL

35

(figura 13)

ROR1-010-D05-VH

ROR1-010-D05-VL

(figura 14)

ROR1-010-D06-VH

40

ROR1-010-D06-VL

(figura 15)

ROR1-011-F01-VH

ROR1-011-F01-VL

(figura 16)

5 Preferiblemente los anticuerpos tienen una CE50 menor de 20 nM según se mide en un sistema basado en ELISA que mide la unión frente a una proteína recombinante.

Un aspecto de la divulgación es un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos tal como se describió en el segundo aspecto de la invención, y que puede usarse para expresar un anticuerpo de la invención.

10 Plásmidos de vector procariota típicos son: pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponibles de Biorad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU.); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, 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.).

15 Un plásmido de vector de célula de mamífero típico es pSVL disponible de Pharmacia (Piscataway, NJ, EE.UU.). Este vector usa el promotor tardío de SV40 para impulsar la expresión de genes clonados, encontrándose el mayor nivel de expresión en células productoras de antígeno T, 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 del tumor de mama de ratón para impulsar la expresión del gen clonado.

20 Vectores de plásmido de levadura útiles son pRS403-406 y pRS413-416 y están generalmente disponibles de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EE.UU.). Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración de 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).

30 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 la transcripción o la traducción apropiados. Un método de este tipo implica ligación mediante colas de homopolímeros. Se añaden colas de homopolímero de polidA (o polidC) a grupos 3'-OH expuestos en el fragmento de ADN que va a clonarse mediante desoxinucleotidil terminal transferasas. Entonces, el fragmento puede hibridarse con las colas de polidT (o polidG) añadidas a los extremos de un vector de plásmido linealizado. Los huecos que quedan tras la hibridación pueden rellenarse mediante ADN polimerasa y unirse los extremos libres mediante ADN ligasa.

35 Otro método implica la ligación mediante extremos cohesivos. Pueden generarse extremos cohesivos compatibles en el fragmento de ADN y el vector mediante la acción de enzimas de restricción adecuadas. Estos extremos se hibridarán rápidamente mediante formación de pares de bases complementarios y mellas que quedan pueden cerrarse mediante la acción de ADN ligasa.

40 Un método adicional usa moléculas sintéticas denominadas ligadores y adaptadores. Se generan fragmentos de ADN con extremos romos mediante ADN polimerasa de bacteriófago T4 o ADN polimerasa I de *E.coli* que eliminan extremos 3'-terminales que sobresalen y rellenan extremos 3' rebajados. Pueden ligarse ligadores sintéticos, fragmentos de ADN bicatenario con extremos romos que contienen secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción definidas, a fragmentos de ADN con extremos romos mediante ADN ligasa de T4. Posteriormente, se digieren 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 químicamente sintetizados que contienen un extremo romo usado para la ligación pero que también presentan un extremo cohesivo previamente formado.

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

55 Una manera deseable de modificar el ADN que codifica para el polipéptido de la invención 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 se flanquea por dos cebadores oligonucleotídicos específicos que se incorporan en el ADN amplificado. Dichos cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que pueden usarse para clonarse en vectores de expresión usando métodos conocidos en la técnica.

60 Un aspecto de la divulgación es una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos o vector de expresión tal como se describieron en los aspectos segundo y tercero de la divulgación.

65 Después se expresa el ADN 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, modificarse de manera apropiada en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento, para construir un vector de expresión, que después 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.^{os} 4.440.859 concedida el 3 de abril de 1984 a Rutter *et al*, 4.530.901 concedida el 23 de julio de 1985 a Weissman, 4.582.800 concedida el 15 de abril de 1986 a Crowl, 4.677.063 concedida el 30 de junio de 1987 a Mark *et al*, 4.678.751 concedida el 7 de julio de 1987 a Goeddel, 4.704.362 concedida el 3 de noviembre de 1987 a Itakura *et al*, 4.710.463 concedida el 1 de diciembre de 1987 a Murray, 4.757.006 concedida el 12 de julio de 1988 a Toole, Jr. *et al*, 4.766.075 concedida el 23 de agosto de 1988 a Goeddel *et al* y 4.810.648 concedida el 7 de marzo de 1989 a Stalker.

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 la introducción del ADN en el huésped y si se desea integración o mantenimiento episomal.

Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en 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 la traducción apropiadas reconocidas por el huésped deseado, aunque tales controles están generalmente disponibles en el vector de expresión. Por tanto, el inserto de ADN puede unirse operativamente a un promotor apropiado. Los promotores bacterianos incluyen los promotores *lacI* y *lacZ* de *E.coli*, los promotores de T3 y T7, el promotor *gpt*, los promotores PR y PL del fago λ , 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 el inicio y la terminación de la transcripción, y en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción (documento WO 98/16643).

Después se introduce el vector en el huésped mediante técnicas convencionales. Generalmente, no todos los huéspedes se transformarán por el vector y, por tanto, será necesario seleccionar 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 un rasgo seleccionable en la célula transformada. Estos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418 o resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucariotas, y genes de resistencia a la tetraciclina, canamicina o ampicilina para el cultivo en *E.coli* y otras bacterias. Alternativamente, el gen para tal rasgo seleccionable puede estar en otro vector, que se usa para transformar conjuntamente la célula huésped deseada.

Después se cultivan las células huésped que se han transformado mediante el ADN recombinante de la invención 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 entonces puede recuperarse.

El polipéptido de la invención puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo precipitación con etanol o sulfato de amonio, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita y cromatografía de lectina. Lo más preferiblemente, se emplea cromatografía de líquidos de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo (pero sin limitarse a) sistemas que emplean: bacterias (por ejemplo *E.coli* y *Bacillus subtilis*) transformadas, por ejemplo, con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, plásmido o cósmido recombinantes; levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*) transformadas, por ejemplo, con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos transformadas, por ejemplo, con vectores de expresión viral (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectados, por ejemplo, con vectores de expresión virales o bacterianos; sistemas de células de animales transfectados, por ejemplo, con vectores de expresión de adenovirus.

Los vectores pueden incluir un replicón procariota, tal como Col E1 *ori*, para la propagación en un procariota, aunque el vector vaya 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 puede dirigir la expresión (transcripción y traducción) de los genes en una célula huésped bacteriana, tal como *E.coli*, transformada con el mismo.

Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite que se produzca la unión de ARN polimerasa y la transcripción. Las secuencias de promotor compatibles con huéspedes bacterianos a modo de ejemplo se proporcionan normalmente en vectores de plásmido que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención.

En un aspecto adicional de la divulgación se proporciona el uso de un anticuerpo tal como se describió en el primer aspecto de la invención en la inducción de muerte celular.

En un aspecto adicional de la divulgación se proporciona un método de inducción de muerte celular en una o más células que comprende exponer una célula que expresa ROR1 a un anticuerpo tal como se describió en el primer aspecto de la invención.

- 5 En un aspecto adicional de la divulgación se proporciona un anticuerpo tal como se describió en el primer aspecto de la invención para su uso en medicina.

10 En un aspecto adicional de la divulgación se proporciona un anticuerpo tal como se describió en el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello y cáncer hepatocelular.

15 Por "tratamiento" se incluyen los significados de que se reduce el número de células cancerosas que caracterizan a la enfermedad que va a tratarse y/o se retarda y/o previene el crecimiento de células cancerosas adicionales y/o se destruyen células cancerosas.

La leucemia linfocítica crónica puede identificarse usando los siguientes criterios:

20 The World Health Organisation (WHO) Classification of Neoplasms of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Harris NL *et al*, Histopathology 2000; 36:69-86). El diagnóstico de CLL (n-100) se basa en la determinación del inmunofenotipo (CD5+/CD19+/CD23+/IgM+) y la presencia de $>5,0 \times 10^9$ linfocitos/l en sangre periférica.

25 Se considera que los pacientes con CLL tienen una 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 diagnosis and treatment. Cheson B *et al*, Blood 87, 4990-4997, 1996, mediante los cuales si hay una progresión durante los 3 meses anteriores de la anemia relacionada con la enfermedad (hemoglobina $<10,0$ g/dl), trombocitopenia ($<100 \times 10^9/l$) y/o un aumento del tamaño del bazo/hígado/ganglios linfáticos y/o un aumento de más de dos veces en el recuento de linfocitos en sangre. Cuando no se cumplen estos
30 criterios, se considera que los pacientes tienen una enfermedad no progresiva.

En un aspecto adicional de la divulgación se proporciona el uso de un anticuerpo tal como se describió en el primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer pancreático y cáncer hepatocelular.
35

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para fabricar una composición farmacéutica (medicamento) que puede usarse para tratar enfermedades tales como leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer pancreático y cáncer hepatocelular.
40

En un aspecto adicional de la divulgación se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo tal como se describió 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 no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer pancreático y cáncer hepatocelular.
45
50

El término "sujeto" significa todos los animales, incluyendo seres humanos. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas y cerdos. El término "paciente" significa un sujeto que tiene un trastorno que necesita tratamiento.

55 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 CLL, se considera que los pacientes tienen enfermedad progresiva si se cumplen los siguientes criterios: progresión durante los 3 meses anteriores de la anemia relacionada con la enfermedad (hemoglobina <100 g/l), trombocitopenia ($<100 \times 10^9/l$) y/o un aumento del tamaño del bazo/hígado/ganglios linfáticos y/o un aumento de más de 2 veces en el recuento de linfocitos en sangre, si no, se
60 considera que los pacientes no presentan progresión.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo tal como se describió en el primer aspecto de la invención y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
65

Los ejemplos describen algunos métodos de producción de formulaciones farmacéuticas, sin embargo el experto

apreciará que la formulación más apropiada dependerá de varios factores, incluyendo la vía de administración, el tipo de paciente (por ejemplo edad del paciente, peso/tamaño).

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

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un kit de partes que comprende:

(i) un anticuerpo tal como se describió en el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica tal como se describió en el decimoprimer aspecto de la invención;

(ii) aparato para administrar el anticuerpo o la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo; y

(iii) instrucciones para su uso.

Aspectos de la divulgación

En los siguientes párrafos numerados se describen aspectos de la divulgación.

1. Anticuerpo anti-ROR1 que puede inducir muerte celular en una célula que expresa ROR1.
2. Anticuerpo según el párrafo 1, en el que el anticuerpo se une específicamente o bien a un dominio extracelular de ROR1, un dominio intracelular de ROR1 o bien a una secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1.
3. Anticuerpo según el párrafo 1 ó 2, en el que el anticuerpo es o bien un anticuerpo completo o bien un fragmento del mismo.
4. Anticuerpo según cualquier párrafo anterior, en el que se induce muerte celular por unión específica del anticuerpo a ROR1 o la secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1.
5. Anticuerpo según cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que el dominio extracelular al que se une el anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos WNISSELNKDSYLTL.
6. Anticuerpo según cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que el dominio intracelular al que se une el anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos NKSQKPYKIDSKQAS.
7. Anticuerpo según cualquier párrafo anterior, que comprende la combinación de secuencias de aminoácidos de regiones V_H y V_L mostradas en una de:
 - figura 4 (ROR1-007-B03-VH y ROR1-007-B03-VL)
 - figura 5 (ROR1-007-C08-VH y ROR1-007-C08-VL)
 - figura 6 (ROR1-007-E06-VH y ROR1-007-E06-VL)
 - figura 7 (ROR1-007-H03-VH y ROR1-007-H03-VL)
 - figura 8 (ROR1-008-A03-VH y ROR1-008-A03-VL)
 - figura 9 (ROR1-008-D04-VH y ROR1-008-D04-VL)
 - figura 10 (ROR1-008-G04-VH y ROR1-008-G04-VL)
 - figura 11 (ROR1-008-H06-VH y ROR1-008-H06-VL)
 - figura 12 (ROR1-009-G03-VH y ROR1-009-G03-VL)
 - figura 13 (ROR1-009-G11-VH y ROR1-009-G11-VL)
 - figura 14 (ROR1-010-D05-VH y ROR1-010-D05-VL)
 - figura 15 (ROR1-010-D06-VH y ROR1-010-D06-VL)
 - figura 16 (ROR1-011-F01-VH y ROR1-011-F01-VL).
8. Anticuerpo según cualquier párrafo anterior, que comprende la combinación de las seis regiones CDR (CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3) mostradas en una de:

- figura 4 (ROR1-007-B03-VH y ROR1-007-B03-VL)
- 5 figura 5 (ROR1-007-C08-VH y ROR1-007-C08-VL)
- figura 6 (ROR1-007-E06-VH y ROR1-007-E06-VL)
- figura 7 (ROR1-007-H03-VH y ROR1-007-H03-VL)
- 10 figura 8 (ROR1-008-A03-VH y ROR1-008-A03-VL)
- figura 9 (ROR1-008-D04-VH y ROR1-008-D04-VL)
- 15 figura 10 (ROR1-008-G04-VH y ROR1-008-G04-VL)
- figura 11 (ROR1-008-H06-VH y ROR1-008-H06-VL)
- figura 12 (ROR1-009-G03-VH y ROR1-009-G03-VL)
- 20 figura 13 (ROR1-009-G11-VH y ROR1-009-G11-VL)
- figura 14 (ROR1-010-D05-VH y ROR1-010-D05-VL)
- 25 figura 15 (ROR1-010-D06-VH y ROR1-010-D06-VL)
- figura 16 (ROR1-011-F01-VH y ROR1-011-F01-VL).
9. Anticuerpo según cualquiera de los párrafos 1 a 8, que comprende al menos una, preferiblemente 2, 3, 4, 5 ó 6 de las regiones CDR mostradas en las figuras 4 a 16:
- 30 figura 4 (ROR1-007-B03-VH y ROR1-007-B03-VL)
- figura 5 (ROR1-007-C08-VH y ROR1-007-C08-VL)
- 35 figura 6 (ROR1-007-E06-VH y ROR1-007-E06-VL)
- figura 7 (ROR1-007-H03-VH y ROR1-007-H03-VL)
- 40 figura 8 (ROR1-008-A03-VH y ROR1-008-A03-VL)
- figura 9 (ROR1-008-D04-VH y ROR1-008-D04-VL)
- figura 10 (ROR1-008-G04-VH y ROR1-008-G04-VL)
- 45 figura 11 (ROR1-008-H06-VH y ROR1-008-H06-VL)
- figura 12 (ROR1-009-G03-VH y ROR1-009-G03-VL)
- 50 figura 13 (ROR1-009-G11-VH y ROR1-009-G11-VL)
- figura 14 (ROR1-010-D05-VH y ROR1-010-D05-VL)
- 55 figura 15 (ROR1-010-D06-VH y ROR1-010-D06-VL)
- figura 16 (ROR1-011-F01-VH y ROR1-011-F01-VL).
10. Anticuerpo según cualquiera de los párrafos 7 a 9, que comprende además las regiones constantes C_H y C_L que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestra en la figura 3.
- 60 11. Anticuerpo según cualquier párrafo anterior, que tiene una CE₅₀ menor de 20 nM según se mide en un sistema basado en ELISA que mide la unión frente a una proteína recombinante.
12. Anticuerpo que se une de manera competitiva al mismo epítipo que los anticuerpos de los párrafos 1 a 11.
- 65 13. Anticuerpo según cualquier párrafo anterior, en el que el anticuerpo muestra una internalización máxima en una célula del 10% tras 30 minutos y/o del 20% tras 30 minutos y/o del 40% tras una hora y/o del 50% tras dos

horas.

14. Secuencia de nucleótidos que codifica para un anticuerpo según cualquier párrafo anterior.
- 5 15. Secuencia de nucleótidos según el párrafo 14, en la que las secuencias de nucleótidos son tal como se muestran en las figuras 4 a 16.
16. Vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos según el párrafo 14 ó 15.
- 10 17. Célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos o vector de expresión según los párrafos 14 a 16.
18. Uso de un anticuerpo según los párrafos 1 a 12 en la inducción de muerte celular de una célula.
- 15 19. Método de inducción de muerte celular en una o más células que comprende exponer una célula que expresa ROR1 a un anticuerpo según los párrafos 1 a 13.
20. Anticuerpo según los párrafos 1 a 13 para su uso en medicina.
- 20 21. Anticuerpo según los párrafos 1 a 13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas no Hodgkin, mieloide crónico, mieloma múltiple, carcinoma de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello y cáncer hepatocelular.
- 25 22. Uso de un anticuerpo según los párrafos 1 a 13 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada de leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas no Hodgkin, mieloide crónico, mieloma múltiple, carcinoma de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello y cáncer hepatocelular.
- 30 23. Método de tratamiento de una enfermedad que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo según los párrafos 1 a 13, en el que la enfermedad se selecciona de leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas no Hodgkin, mieloide crónico, mieloma múltiple, carcinoma de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello y cáncer hepatocelular y cáncer hepatocelular.
- 35 24. Anticuerpo, uso o método según los párrafos 21 a 23, en el que la enfermedad es progresiva.
- 40 25. Anticuerpo, uso o método según los párrafos 21 a 23, en el que la enfermedad es leucemia linfocítica crónica.
26. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según los párrafos 1 a 13 y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 27. Composición farmacéutica según el párrafo 26, que induce muerte celular en una célula que expresa ROR1.
28. Kit de partes que comprende:
 - 50 (i) un anticuerpo según los párrafos 1 a 13 o una composición farmacéutica según los párrafos 26 ó 27;
 - (ii) aparato para administrar el anticuerpo o la composición farmacéutica; y
 - 55 (iii) instrucciones para su uso.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos implementan diversos aspectos de la invención.

- 60 Los siguientes ejemplos se describen con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

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

- 65 El gen *ROR-1* humano tiene una región codificante de 2814 pb con una secuencia predicha de 937 aminoácidos y un tamaño de proteína de 105 kDa que incluye un dominio de tipo Ig, dominio rico en cisteína, dominio Kringle, dominio tirosina cinasa y dominio rico en prolina.

Se indican las posiciones del sitio de reconocimiento de anticuerpo 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 que indica parte de los genes sobreexpresados en bB-CLL.

Figura 3 - Secuencias de aminoácidos de regiones constantes.

Figuras 4 a 16 - Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos que codifican para las regiones variables de anticuerpos anti-ROR1. Las regiones CDR se destacan en recuadros (y se marcan como CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3), y también se marcan en negrita mutaciones en las regiones de entramado.

Figura 4 - (ROR1-007-B03-VH y ROR1-007-B03-VL).

Figura 5 - (ROR1-007-C08-VH y ROR1-007-C08-VL).

Figura 6 - (ROR1-007-E06-VH y ROR1-007-E06-VL).

Figura 7 - (ROR1-007-H03-VH y ROR1-007-H03-VL).

Figura 8 - (ROR1-008-A03-VH y ROR1-008-A03-VL).

Figura 9 - (ROR1-008-D04-VH y ROR1-008-D04-VL).

Figura 10 - (ROR1-008-G04-VH y ROR1-008-G04-VL).

Figura 11 - (ROR1-008-H06-VH y ROR1-008-H06-VL).

Figura 12 - (ROR1-009-G03-VH y ROR1-009-G03-VL).

Figura 13 - (ROR1-009-G11-VH y ROR1-009-G11-VL).

Figura 14 - (ROR1-010-D05-VH y ROR1-010-D05-VL).

Figura 15 - (ROR1-010-D06-VH y ROR1-010-D06-VL).

Figura 16 - (ROR1-011-F01-VH y ROR1-011-F01-VL).

Figura 17. Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a ROR1.

Se mostró que los anticuerpos se unían a la proteína ROR1 pero no a proteína de control según se sometió a ensayo mediante ELISA.

Figura 18. Los anticuerpos específicos para ROR1 se unen a células de CLL primarias.

Los anticuerpos se unen a células de CLL obtenidas de sangre periférica de dos pacientes con CLL según se mide mediante FACS. Las líneas negras muestran la media geométrica de la señal fluorescente y la línea gris muestra el porcentaje de células teñidas de manera positiva. Se usó tinción con rituximab como control positivo.

Figura 19. Los anticuerpos específicos para ROR1 no se unen a CMSP primarias de voluntarios sanos.

Los anticuerpos no se unen a células CMSP obtenidas de sangre periférica de dos voluntarios sanos según se midió mediante FACS. Las líneas negras y blancas muestran la media geométrica de la señal fluorescente de los dos donantes diferentes, y las líneas grises muestran el porcentaje de células teñidas de manera positiva.

Figura 20. Los anticuerpos específicos para ROR-1 inducen la apoptosis de células de CLL primarias.

Los anticuerpos inducen la apoptosis de células de CLL obtenidas de sangre periférica de dos pacientes con CLL. Se incuban las células de CLL por duplicado con anticuerpos específicos para ROR-1 a 1 µg/ml en presencia de fragmentos F(ab')₂ de reticulación durante 16 h. Después de eso, se tiñen las células con anexina V, que mide las células apoptóticas tempranas, así como SYTOX, que mide las células apoptóticas tardías, necróticas o mediante otros medios células con una membrana celular con fugas. De ese modo, se cuentan las células no teñidas como viables. *** = p<0,001, ** = p< 0,01, * = p<0,05 según se calcula mediante ANOVA usando corrección de Bonferroni para análisis múltiples. Se usan el agente citotóxico paclitaxel y el anticuerpo terapéutico específico para CD20

rituximab como controles positivos.

Figura 21. Ejemplos de imágenes de FACS para la determinación de la viabilidad de células de CLL primarias.

5 Las células ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo de cada panel son viables. Las células en el inferior derecho son apoptóticas tempranas, las células en el superior izquierdo tienen una membrana celular permeabilizada y, por tanto, no son viables, y las células en el superior derecho se considera que son apoptóticas tardías o necróticas.

10 Figura 22. Los anticuerpos específicos para ROR1 median en ADCC dependiente de NK de células de CLL primarias de paciente.

15 Se usaron células de CLL primarias de paciente como células diana y células NK primarias aisladas de capas leucocíticas como células efectoras y se usaron a una razón de 1:40. Se cargan las células diana con calceína antes del ensayo y se usa la calceína liberada en los medios para medir la lisis mediada por células NK. La figura muestra datos resumidos de 3 pacientes con CLL diferentes y células NK de un total de 5 donantes \pm EEM.

Figura 23. Los anticuerpos específicos para ROR-1 empobrecen las células de CLL primarias transferidas a ratones inmunodeficientes.

20 Se transfirieron células de CLL primarias aisladas del paciente 2 a ratones NOD.SCID inmunodeficientes y se trataron con 10 mg/kg del anticuerpo específico para ROR-1 009-G03 en el día 1 y 4 tras la transferencia. En el día 7, se extrajeron líquido peritoneal y bazo y se cuantificaron las células de CLL humanas mediante tinción triple para detectar CD45, CD19 y CD5. El anticuerpo 009-G03 reduce significativamente el número de células de CLL en el líquido peritoneal. Además, también hay una tendencia muy fuerte hacia números reducidos en el tejido esplénico.
25 N=4 ratones / grupo, $*=p<0,05$ según se calcula mediante la prueba de la T. Se calculan los valores en el bazo usando la prueba de Mann-Whitney para valores no paramétricos (debido a diferencias significativas en las varianzas).

30 Figura 24. Los anticuerpos específicos para ROR1 se unen a células RPMI 8226, una línea celular para mieloma múltiple.

35 Los anticuerpos se unen a células RPMI 8226 (n.º ATCC: CLL-155) según se mide mediante FACS. Las líneas negras muestran la media geométrica de la señal fluorescente y la línea gris muestra en porcentaje de células teñidas de manera positiva.

Figura 25. Los anticuerpos específicos para ROR-1 inducen apoptosis de células RPMI 8226, una línea celular representativa de mieloma múltiple.

40 Los anticuerpos inducen apoptosis de células RPMI 8226. Se incubó la línea celular por duplicado con dos anticuerpos específicos para ROR-1 a 10 ó 1 μ g/ml en presencia de fragmentos $F(ab')_2$ de reticulación durante 16 h. Después de eso, se tiñen las células con anexina V, que mide las células apoptóticas tempranas, así como SYTOX, que mide las células apoptóticas tardías, necróticas o mediante otros medios células con una membrana celular con fugas. De ese modo se cuentan las células no teñidas como viables. $*** = p<0,001$, $** = p< 0,01$ según se calcula mediante ANOVA usando corrección de Bonferroni para análisis múltiples. Se usa el agente citotóxico paclitaxel como control positivo.
45

Figura 26. Ejemplos de imágenes de FACS para la determinación de la viabilidad de células RPMI8226.

50 Las células ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo de cada panel son viables. Las células en el inferior derecho son apoptóticas tempranas, las células en el superior izquierdo tienen una membrana celular permeabilizada y, por tanto, no son viables, y las células en el superior derecho se considera que son apoptóticas tardías o necróticas.

Figura 27. Los anticuerpos específicos para ROR1 median en ADCC dependiente de NK en la línea celular de MM.

55 Se usó la línea celular de MM, RPMI-8226, como células diana y células NK primarias aisladas de capas leucocíticas como células efectoras y se usan a una razón de 1:40. Se usa la liberación de GADPH endógeno para medir la lisis. Las figuras A y B muestran datos de repeticiones triples \pm DE usando células NK de dos donantes diferentes respectivamente.

60 Figura 28. Los anticuerpos específicos para ROR1 se unen a células de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549 y a células de cáncer de próstata DU145 e inducen muerte celular.

65 Panel A. Los anticuerpos se unen a células A549 (n.º ATCC: CCL-185) y DU145 (n.º ATCC: HTB-81) según se mide mediante FACS.

Paneles B y C. A pesar de la unión más bien débil, los anticuerpos específicos para ROR1 inducen una muerte

celular significativa en las líneas celulares de NSCLC y de cáncer de próstata A549 y DU145 según se mide mediante el ensayo de citotoxicidad multiplexado MultiTox-Glo adecuado para células adherentes.

Figura 29. Afinidad de 009-G03.

5 Se determinó que la afinidad (KD) del anticuerpo 009-G03 era de 1,0 nM. Se realizó la evaluación con un gráfico de Scatchard de la unión a RPMI-8226 del anticuerpo 009-G03 específico para ROR1 marcado con ¹²⁵I. La figura A muestra la curva saturada y la figura B muestra el gráfico de Scatchard.

10 Figura 30. Células de CLL primarias de paciente investigadas en ratones NOD.SCID inmunodeficientes.

Se inyectan por vía intravenosa células de CLL primarias de paciente en ratones NOD.SCID inmunodeficientes. Las células de CLL se dirigen al bazo y ahí forman agrupaciones proliferantes, de manera muy similar a la enfermedad humana. Tras permitir la sedimentación en el bazo durante 5-7 días, se trataron los ratones con anticuerpos anti-ROR1 10 mg/kg cada tres días y se terminó tras (A) 7 días, n= 7 ratones / grupo; (B) 7 días, n= 9-10 ratones / grupo; (C) 4 días, n= 8 ratones / grupo; (D) 3 días, n= 5 ratones / grupo. En la terminación, se cuantificó el número de células de CLL en el bazo usando tinción de FACS de CD45, CD19 y CD20 humanos. Cada figura representa células de pacientes con CLL individuales.

20 Ejemplo 1-Generación de anticuerpos específicos para Ror1

Aislamiento de fragmentos de anticuerpo scFv

25 Se usó la biblioteca de scFv n-CoDeR® (BioInvent) para aislar fragmentos de anticuerpo scFv que reconocen ROR-1 humano.

30 Se usó la biblioteca de fagos en una selección de fagos por afinidad (*biopanning*) diferencial con células de CLL como células diana y un exceso de CMSP empobrecidas en células B como competidor. Después de la incubación de fagos, se lavaron las células para retirar fagos no unidos. Se eluyeron los fagos de unión con tripsina y se amplificaron en *E. coli*. Se realizaron dos selecciones de fagos por afinidad consecutivas y la reserva de fagos resultante o bien se convirtió en formato de scFv o bien se usó en una tercera selección contra ROR-1 humano recombinante antes de la conversión en scFv. Se transformó *E. coli* con plásmidos que portan scFv y se expresaron clones de scFv individuales.

35 Identificación de scFv de unión a ROR-1 único

Se sometieron a ensayo scFv convertidos de la tercera serie de selección contra ROR-1 humano recombinante para determinar la unión a hROR-1 recubierto con etiqueta Fc de IgG3 murina pero no a IgG3 murina recubierta.

40 Se recubrieron 0,3 pmoles/pocillo de hROR o mIgG3 en una placa de ELISA y se incubaron durante la noche a +4°C. Después del lavado, se permitió que el sobrenadante de scFv se uniera a la placa recubierta durante 1 h. Se detectó scFv unido usando anticuerpo anti-FLAG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) seguido por sustrato CDP-Star (Tropix). Se secuenciaron scFv de unión a ROR para identificar clones únicos usando técnicas de secuenciación convencionales y se analizaron todos los clones únicos para determinar la unión a células tal como se describe a continuación. Se convirtieron todos los clones de ScFv de unión a células en formato IgG.

50 Se sometieron a ensayo scFv convertidos de la segunda selección contra células de CLL para determinar la unión a células de CLL pero no a CMSP empobrecidas en células B. Se bloquearon células de CLL o CMSP con IgG humana purificada a partir de suero humano (IVIG, Sigma) 0,2 µg/ml durante 10 min a +4°C antes de la adición de sobrenadante de scFv durante 1 h a +4°C.

Después del lavado, se detectó scFv usando anticuerpo anti-HIS de ratón (R&D Systems) seguido por lavado y detección con anticuerpo anti-F(ab)² de ratón conjugado con alofocianina (Jackson Immunoresearch).

55 Finalmente, se analizó la unión de scFv con citometría de flujo. Se secuenciaron scFv de unión a CLL para identificar clones únicos usando técnicas de secuenciación convencionales y se analizaron todos los clones únicos para determinar la unión a ROR en ELISA tal como se describió anteriormente.

IgG de unión a ROR-1 en ELISA

60 Se analizaron clones de IgG convertidos para determinar la unión a ROR en ELISA. Se usó ROR-1 humano recombinante con etiqueta Fc de IgG3 murina como diana y mIgG3 como no diana. Se recubrió ROR-1 o mIgG3 a 1 pmoles/pocillo en placas de ELISA durante la noche a +4°C. Se diluyó en serie IgG en PBS + Tween al 0,05% y gelatina de pescado al 0,45% (Sigma) desde 50 µg/ml hasta 0,02 µg/ml (de 333 nM a 0,16 nM) o desde 600 ng/ml hasta 0,3 ng/ml (de 4 nM a 0,002 nM) y se añadió a la placa recubierta durante 1 h a temperatura ambiente.

65

Después de lavar con PBS + Tween al 0,05%, se detectó IgG unida con anticuerpo anti-anticuerpo humano conjugado con peroxidasa del rábano (Jackson ImmunoResearch) diluido hasta 50 ng/ml en PBS + Tween al 0,05% y gelatina de pescado al 0,45%.

5 Finalmente, se diluyó el sustrato; Supersingal pico (Pierce) 10 veces en tampón TRIS, se añadió a la placa lavada y se incubó durante 10 min antes de la lectura de la luminiscencia usando un lector de placas (Tecan Ultra).

Se mostró que los anticuerpos se unían a la proteína ROR1 pero no a la proteína de control tal como se sometió a ensayo mediante ELISA (véase la figura 17).

10 IgG de unión a células de CLL en citometría de flujo

Se analizaron clones de IgG convertidos para determinar la unión a células de CLL pero no a CMSP empobrecidas en células B en citometría de flujo. Se marcó IgG con fragmentos Fab conjugados con Alexa Fluor 647, Zenon, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y se diluyó hasta 10 µg/ml en PBS + BSA al 0,5%. Se bloquearon células de CLL o CMSP con IgG humana purificada a partir de suero humano (IVIG, Sigma) 0,2 µg/ml durante 10 min a +4°C antes de la incubación durante 1 h a +4°C con la IgG marcada.

20 Finalmente, se lavaron las células y se detectó la unión de IgG en un citómetro de flujo (BD FACS Calibur).

Ejemplo 2 – AcM específicos de ROR1 se unen principalmente a células de CLL pero no a CMSP aisladas de voluntarios sanos

25 Aislamiento de células de CLL y CMSP

Se aislaron células de CLL de sangre periférica de pacientes voluntarios con CLL humanos. Se aislaron CMSP de capas leucocíticas derivadas de muestras de sangre de voluntarios sanos.

30 En resumen, se diluyeron sangre completa (CLL) o capas leucocíticas (CMSP normales) 1:2 en PBS y se cargaron en medios Ficoll-Paque Plus (Amersham). Se centrifugaron las muestras a 400xg_{av} durante 40 min a 20°C.

Se retiró la fase superior que contenía plasma y se aislaron células mononucleares de la banda blanca distintiva en la interfase de plasma/Ficoll. Se retiraron plaquetas de la suspensión de células mononucleares lavando con volumen 4x de PBS, centrifugación a 60xg_{av} durante 10 min a 20°C, y aspiración completa del sobrenadante.

35 Análisis de FACS

Se analizaron clones de IgG convertidos para determinar la unión a células de CLL y CMSP. Se marcó IgG con fragmentos Fab conjugados con Alexa Fluor 647, Zenon, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y se diluyó hasta 10 µg/ml en PBS + BSA al 0,5%. Se bloquearon células de CLL y CMSP con IgG humana 0,2 µg/ml durante 10 min a +4°C antes de la incubación durante 1 h a +4°C con la IgG marcada purificada a partir de suero humano (IVIG, Sigma). Finalmente, se lavaron las células y se detectó la unión de IgG en un citómetro de flujo (BD FACS Calibur).

45 Se mostró que los anticuerpos se unían específicamente a células de CLL pero no a células CMSP obtenidas de sangre periférica de voluntarios sanos según se midió mediante FACS (figura 18 y 19).

Ejemplo 3 - Inducción de muerte de células de CLL mediante AcM frente a ROR1

50 Se expresaron de manera transitoria todos los clones de anticuerpo anti-Ror-1 y el anticuerpo de control FITC-8GA en células HEK293. Se analizaron todos los anticuerpos producidos para determinar los niveles de endotoxina (<1 U/ml) y se confirmó la unión al antígeno respectivo mediante un citómetro de flujo y ELISA (figuras 17-19).

Aislamiento y cultivo de células de CLL

55 Se aislaron células de CLL tal como se describió anteriormente y entonces se suspendieron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomocina al 1%.

Ensayo de apoptosis de células de CLL

60 Se sembraron células de CLL en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 1x10⁶ células/ml de medio de cultivo (100.000 células/pocillo). Se añadió 1 µg/ml de un anticuerpo anti-ROR-1 o de un anticuerpo de control de isotipo (anti-FITC-8) a las células, en presencia o ausencia de anticuerpo anti-Fab(ab)² humano 3 µg/ml (específico para el fragmento Fcγ, Jackson ImmunoResearch) para reticulación. Entonces se incubaron las células durante 16 horas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.

65

Análisis de citometría de flujo de inducción de apoptosis y expresión de ROR-1

5 Se recogieron las células y se tiñeron para determinar células necróticas con la tinción de núcleos SYTOX Green, y para determinar células apoptóticas usando anexina V-647 (Invitrogen). Se identificaron células necróticas mediante fluorescencia aumentada en el canal FL-1 y células apoptóticas mediante señal aumentada en el canal FL-4 en un citómetro de flujo (FACSCalibur, BD Bioscience) (figuras 20 y 21).

10 Ejemplo 5 – Efectos *in vivo* de AcM frente a ROR1

Se aislaron CMSP de sangre periférica de un paciente con CLL usando la técnica Ficoll Hipaque. Se tiñeron las células para determinar CD19-PE y CD5-APC (BD) para enumerar células de CLL, que se encontró que era el 89,6% de las CMSP (datos no mostrados). En comparación, sólo el 1,1 % eran células T.

15 Después de eso, se inyectaron 150×10^6 células por vía i.p e i.v en ratones NOD.SCID. Se trataron los ratones por vía i.p con 10 mg/kg del AcM específico para ROR1 009-G03, o control negativo irrelevante en el día 1 y 4 después de la transferencia. Se sacrificaron los ratones el día 7 y se recogieron células intraperitoneales usando lavado intraperitoneal de 8 ml de PBS. Se tiñeron las células recuperadas del peritoneo para determinar anticuerpo anti-CD45, anti-CD3 (tinción de células de origen humano y células T humanas, respectivamente), anti-CD19 y anti-CD5 (tinción de células de CLL) humanos (todos anticuerpos de BD).

En comparación con el control de isotipo, el AcM 009-G03 reduce significativamente el número de células injertadas de CLL. Esto muestra que el tratamiento con anticuerpo anti-Ror1 empobrece específicamente células de CLL humanas primarias en un modelo *in vivo* de xenoinjerto (figura 23).

25 Ejemplo 6. Los anticuerpos específicos para Ror1 se unen y eliminan células RPMI 8226 *in vitro*, una línea celular para mieloma múltiple.

30 Se obtuvieron células RPMI 8226 de ATCC y se cultivaron según las instrucciones. Para la unión, se marcó IgG con fragmentos Fab conjugados con Alexa Fluor 647, Zenon, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y se diluyó hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS + BSA al 0,5%. Se bloquearon las células RPMI 8226 con IgG humana 0,2 $\mu\text{g/ml}$ durante 10 min a $+4^\circ\text{C}$ antes de la incubación durante 1 h a $+4^\circ\text{C}$ con la IgG marcada. Finalmente, se lavaron las células y se detectó la unión de IgG en un citómetro de flujo (BD FACS Calibur).

35 Para ensayos de inducción de muerte celular, se sembraron células RPMI 8226 en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/ml de medio de cultivo (100.000 células/pocillo). Se añadieron 10 ó 1 mg/ml de un anticuerpo anti-ROR-1 o de anticuerpo de control de isotipo (anti-FITC-8) a las células, en presencia o ausencia de 30 ó 3 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-Fab(ab')² humano (específico de fragmento Fc γ , Jackson ImmunoResearch) para reticulación. Entonces se incubaron las células durante 16 horas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ (figuras 24, 25 y 26).

Ejemplo 7. Los anticuerpos específicos para Ror1 se unen a células de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549 y células de cáncer de próstata DU145 e inducen muerte celular *in vitro*.

45 Se obtuvieron las células de ATCC y se cultivaron según las instrucciones. Se usaron líneas celulares A549 (n.º ATCC: CCL-185) y DU145 (n.º ATCC: HTB-81).

Para la unión, se disociaron células usando tampón de disociación libre de enzimas y después de eso, se tiñeron con anticuerpos marcados con Zenon tal como se describió anteriormente.

50 Para ensayos de muerte celular, se sembraron células en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de $1,4 \times 10^5$ células/ml de medio de cultivo (7000 células/pocillo). Se añadieron 10 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-ROR-1 o de un anticuerpo de control de isotipo (anti-FITC-8) a las células, en presencia de exceso de 5 M anticuerpo anti-Fab(ab')² humano (específico de fragmento Fc γ , Jackson ImmunoResearch) para reticulación. Se añadió paclitaxel, un control positivo para muerte celular a 5 $\mu\text{g/ml}$. Entonces se incubaron las células durante 24 y 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.

55 El ensayo de citotoxicidad multiplexado MultiTox-Glo (Promega) es un ensayo fluorescente y luminiscente de adición de reactivo secuencial que mide el número relativo de células vivas y muertas, respectivamente en poblaciones celulares. Se realizó el ensayo según lo recomendado por el fabricante.

65 En la figura 28, los paneles A a C muestran los resultados del análisis de FACS. El panel A muestra que los anticuerpos se unen a células A549 y DU145 (según se midió mediante FACS). Los paneles B-C muestran que a pesar de la unión más bien débil, los anticuerpos específicos para Ror1 inducen muerte celular significativa en las líneas celulares de NSCLC y de cáncer de próstata A549 y DU145.

Ejemplo 8 – Identificación de anticuerpos de competencia

Métodos de identificación de anticuerpos que compiten contra los creados y sometidos a prueba son los siguientes:

Método 1 - FACS

A realizar preferiblemente con células de CLL primarias, pero si no están disponibles, pueden usarse células RPMI 8226.

Se añaden en primer lugar anticuerpos marcados creados anteriormente (diluidos hasta 20 µg/ml en tampón de FACS) y se deja que se unan a las células mediante incubación durante 20 min sobre hielo, usando un anticuerpo de control de isotipo relevante (normalmente IgG) como control negativo. Se lavan las células.

Se añade el anticuerpo que va a someterse a prueba en cuanto a su unión de competencia (y se marca con un color diferente) y también se deja que se incube durante 20 min sobre hielo después de lo cual se lavan las células.

Después se cuantifican las señales en una máquina de FACS adecuada.

Si el anticuerpo que va a someterse a prueba se une al mismo epítipo, su señal se inhibe significativamente mediante los anticuerpos creados anteriormente en comparación con el control negativo.

Además, esto puede someterse a prueba adicionalmente realizando el experimento inverso añadiendo el anticuerpo competidor antes que los anticuerpos creados anteriormente y cuantificando las señales.

Método 2 - ELISA

Se recubre una placa de ELISA con proteína ROR1 y se incuba en primer lugar con los anticuerpos creados anteriormente (diluidos hasta 20 µg/ml en tampón de recubrimiento adecuado). Se deja que se unan a las células mediante incubación durante 1 h a temperatura ambiente, usando un anticuerpo de control de isotipo relevante (normalmente IgG) como control negativo. Se lava la placa.

Se añade el anticuerpo que va a someterse a prueba para determinar la competición, marcado, por ejemplo, con biotina o similar, y se permite la incubación durante 1 h a temperatura ambiente después de lo cual se lavan las placas. Se añade la detección secundaria y se cuantifican las señales en un lector de ELISA adecuado.

Si el anticuerpo que va a someterse a prueba se une al mismo epítipo, su señal se inhibe significativamente mediante los anticuerpos creados anteriormente en comparación con el control negativo.

Como con el análisis de FACS, esto puede someterse a prueba en el experimento inverso añadiendo el anticuerpo que va a someterse a prueba antes que los anticuerpos creados anteriormente.

Ejemplo 9. Determinación de la afinidad y pruebas de ADCC

Determinación de la afinidad

Se marcó el anticuerpo con ¹²⁵I usando yodo libre y tubos de ensayo previamente recubiertos con el reactivo oxidante Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3α,6α-difenilglicolurilo, Thermo scientific), según las instrucciones del fabricante. En resumen, se marcaron 200 µg de anticuerpo durante 10 minutos en PBS y se retiró el yodo libre usando una pequeña columna de desalación desechable (NAP 5, GE Healthcare Life science). El anticuerpo marcado tenía una actividad específica de aproximadamente 2,5 uCi/µg de anticuerpo y contenía menos del 1% de yodo libre según se estimó con cromatografía en papel. Se incubaron 0,5x10⁶ células durante 2,5 h sobre hielo con diferentes concentraciones de anticuerpo 009-G03 marcado con ¹²⁵I. Se separó anticuerpo no unido libre (F) del anticuerpo unido a célula (B) mediante centrifugación a través de una almohadilla de Ficoll al 40% y se analizaron muestras en un contador gamma (figura 29).

ADCC

Método de aCella-TOX

Se evaluó la línea celular RPMI-8226 en reacciones de ADCC con anticuerpos IgG1 anti-ROR1 derivados de n-CoDeR, usando el kit aCella-TOX (Cell Technology Inc).

El día antes del ensayo de ADCC, se aislaron células NK efectoras de capas leucocíticas de donantes humanos sanos. En primer lugar se extrajeron células mononucleares de sangre periférica usando Ficoll-Paque PLUS (GE

Healthcare Life Sciences), seguido por marcaje magnético y separación de células NK según el protocolo convencional (Miltenyi Biotec). Se mantuvieron las células NK en medio de crecimiento durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se recogieron células diana, se contaron y se prepararon en 100 µl de suspensiones en medio que contenían 250000 células. Se añadieron anticuerpos anti-ROR1, así como control de isotipo, hasta una concentración de recubrimiento final de 5-10 µg/ml. Tras una incubación de 1 h sobre hielo, se diluyeron las suspensiones de células en medio hasta 50000 células/ml. Posteriormente, se dispensaron 100 µl de la disolución respectiva por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (en forma de V), proporcionando 5000 células/pocillo. A continuación, volvieron a suspenderse células NK aisladas en medio y se añadieron (100 µl/pocillo) a las placas de cultivo a un exceso de 40:1 en comparación con las células diana usadas. Se incubaron las reacciones celulares durante 4 h a 37°C, seguido por transferencia de 100 µl/pocillo de sobrenadante a placas de lectura blancas de fondo plano. Finalmente, se evaluó el nivel de enzima GAPDH en células diana endógena liberada usando los reactivos de aCella-TOX suministrados, según una medición de la citotoxicidad mediada por células NK dependiente de anticuerpo específico.

Véase la figura 27 para resultados usando ROR 009 G03, ROR 010 D06 y ROR 008 H06.

Método calceína AM

Se aislaron células NK efectoras humanas un día antes del ensayo de ADCC, tal como se describió anteriormente. Además, se aislaron células de CLL con Ficoll-Paque PLUS el mismo día y se mantuvieron en DPBS + FBS inactivado por calor al 10% (reactivos de Invitrogen) a 4°C. En el día del experimento de ADCC, se recogieron las células de CLL, se contaron y se cargaron con tinte fluorescente calceína AM 10 µM (BD Biosciences) en medio. Tras un lavado exhaustivo en medio, posteriormente se prepararon suspensiones que contenían 100000 células y se incubaron con anticuerpos anti-ROR1 (y de control) a 5 µg/ml durante 30 min - 1 h sobre hielo. Después se diluyeron las muestras hasta 1 ml (en medio) y se dispensaron a 100 µl en placas de cultivo tisular. Se añadieron células NK aisladas tal como se describió anteriormente y se incubaron las placas durante 4 h a 37°C. Posteriormente, se transfirieron 100 µl/pocillo de sobrenadante a placas de lectura de fondo plano negras. Después se leyeron las muestras para determinar la espectrofluorescencia a 485/535 nm (excitación/emisión), en las que la intensidad de señal de calceína liberada corresponde a la citotoxicidad mediada por células NK dependiente de anticuerpo (figura 22).

Ejemplo 10 – Investigación *in vivo* adicional de células de CLL derivadas de paciente

Ratones NOD.SCID recibieron irradiación en todo el cuerpo de 1 Gy 1 día antes de la inyección de células primarias de paciente.

Se aislaron CMSP a partir de sangre periférica de cuatro pacientes con CLL usando la técnica Ficoll Hypaque. Después de eso, se inyectaron 100×10^6 células por vía i.v. en ratones NOD.SCID irradiados. Se trataron los ratones por vía i.p. con 10 mg/kg del AcM específico para ROR1 009-G03, o AcM de control negativo irrelevante en el día 5-7 después de la transferencia de células a ratones y se sacrificaron 3-7 días después. Cuando los ratones se sacrificaron a los 7 días tras la administración de AcM inicial, se administró una segunda inyección de AcM 8-11 días después de la transferencia.

Se disecaron los bazo, se desmenuzaron y se sometieron a lisis para determinar los glóbulos rojos. Se tiñó la suspensión de células con AcM conjugados con fluorocromo que reconocían CD45, CD19 o CD20 humanos y se cuantificaron las células de CLL como que eran o bien CD45⁺CD19⁺ o bien CD45⁺CD20⁺. Todos de tales anticuerpos se adquirieron de BD Biosciences.

En comparación con el control de isotipo, los AcM 009-G03 y 010-D06 reducen significativamente el número de células de CLL injertadas en el bazo. Se cree que las células de CLL que residen en órganos linfoides son significativamente más difíciles de seleccionar como diana en comparación con células que circulan en la sangre y que este es uno de los motivos para el fallo del tratamiento en pacientes con CLL. El solicitante ha mostrado que los AcM que seleccionan como diana ROR1 pueden empobrecer significativamente las células de CLL humanas primarias en un modelo *in vivo* de xenoinjerto altamente relevante (figura 30).

Ejemplo 11 – Medición de la internalización usando FACS

Se transfieren como alícuota aproximadamente 250000 células de CLL/muestra de FACS, se lavan una vez en tampón de FACS que contiene PBS y FCS al 2%. Se bloquea la unión de Fc no específica usando 100 µl de tampón de FACS que contiene γ -globulina de ratón 100 µg/ml, se incuba durante 10 minutos. Se añaden condiciones de saturación del AcM para ROR1 en investigación, por ejemplo 10 µg/ml en medios y se incuba o bien durante 30 min sobre hielo (valor de referencia) o bien a 37°C durante 2 h (valor tras 2 h de internalización). Se lava dos veces con tampón de FACS. Se añade AcM de detección secundario diluido según las instrucciones del fabricante. Se incuba durante 20 min sobre hielo y después de eso se lava dos veces con tampón de FACS. Vuelven a suspenderse las células en tampón de FACS y se analizan. Se calcula la internalización en porcentaje como:

$$1 - \frac{(\text{Intensidad de fluorescencia media tras 2 h a } 37^{\circ}\text{C})}{\text{Intensidad de fluorescencia media tras 30 min sobre hielo}} \times 100$$

Ejemplo 12 - Formulaciones farmacéuticas preferidas y modos y dosis de administración.

5

Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la presente invención pueden administrarse usando un sistema de administración de fármaco de liberación sostenida inyectable. Estos se diseñan específicamente para reducir la frecuencia de inyecciones. Un ejemplo de un sistema de este tipo es Nutropin Depot que encapsula hormona del crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectadas, liberan rhGH lentamente a lo largo de un periodo sostenido.

10

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 sistémicos significativos del fármaco.

15

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

20

También pueden suministrarse polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención mediante electroincorporación (EI). La EI se produce cuando pequeñas partículas 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 impulsan a través del estrato córneo y al interior de capas más profundas de la piel. Las partículas pueden cargarse o recubrirse con fármacos o genes o simplemente pueden actuar como "balas" que generan poros en la piel a través de los cuales pueden entrar los fármacos.

25

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 depósito de gel que se erosiona lentamente y se disuelve para dar polímeros conocidos biodegradables y seguros. El fármaco activo se suministra a lo largo del tiempo a medida que se disuelven los biopolímeros.

30

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 transportar compuestos hidrófilos a través de la membrana plasmática. Este sistema permite el direccionamiento directo de oligopéptidos al citoplasma y al núcleo, y pueden ser altamente eficaces y no específicos del tipo de célula (Derossi *et al.*, 1998, Trends Cell Biol., 8, 84-87).

35

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

40

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, inorgánica u orgánica no tóxica, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y del paciente que va a tratarse, así como de la vía de administración, las composiciones pueden administrarse a dosis variables.

45

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

50

Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención también pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Se usan mejor en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales suficientes o glucosa como para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deben tamponarse de manera adecuada (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.

55

60

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que

5 pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase anteriormente descrita.

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

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

15 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la 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 manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

20 Formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una unidad o dosis diaria, subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, de un principio activo.

25 Un sistema de administración preferido de la invención puede comprender un hidrogel impregnado con un polipéptido, polinucleótido y anticuerpo de la invención, que se transporta preferiblemente en un tampón que puede insertarse en el cuello uterino y extraerse una vez producida una maduración apropiada del cuello uterino u otro efecto deseable en el aparato reproductor femenino.

30 Debe entenderse que además de los componentes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica relacionados con el tipo de formulación en cuestión.

Ejemplo 13 – Formulaciones farmacéuticas a modo de ejemplo

35 Aunque es posible administrar polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención solos, es preferible presentarlos como una formulación farmacéutica, junto con uno o más portadores aceptables. El/los portador(es) debe(n) ser “aceptable(s)” en el sentido de ser compatible(s) con el compuesto de la invención y no perjudicial(es) para los receptores del/de los mismo(s). Normalmente, los portadores serán agua o solución salina que serán estériles y estarán libres de pirógenos.

40 Los siguientes ejemplos ilustran formulaciones farmacéuticas según la invención en las que el principio activo es un polipéptido, polinucleótido y/o anticuerpo de la invención.

Ejemplo 13A: Formulación inyectable

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

Se disuelve el principio activo en la mayor parte del tampón de fosfato (35-40°C), después se completa el volumen y se filtra a través de un filtro de microporos estéril en un vial de vidrio ámbar estéril de 10 ml (tipo 1) y se sella con

50 cierres y sellos estériles.

Ejemplo 13B: Inyección intramuscular

Principio activo 0,20 g
Alcohol bencílico 0,10 g
GlucofuroI 75® 1,45 g
Agua para inyección c.s. para 3,00 ml

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-ROR1 que puede inducir muerte celular en una célula que expresa ROR1, comprendiendo dicho anticuerpo anti-ROR1 la combinación de secuencias de aminoácidos de regiones V_H y V_L mostradas en una de:
- 5
- (a)
- EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSAISGSGG
 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKEDWEGASFDYWGQG
 TLVTVSS
- 10 (ROR1-009-G03-V_H) y
- QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGINTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP
 SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLSGWVFGGGTKLTVLG
- 15 (ROR1-009-G03-V_L); o
- (b)
- EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG
 STFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGRSAGSMGYFDYWG
 QGTLVTVSS
- 20 (ROR1-010-D06-V_H) y
- QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNR
 PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLG
- 25 (ROR1-010-D06-V_L).
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une específicamente o bien a un dominio extracelular de ROR1, un dominio intracelular de ROR1 o bien a una secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1.
- 30
3. Anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es o bien un anticuerpo completo o bien un fragmento del mismo.
4. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se induce muerte celular por unión específica del anticuerpo a ROR1 o a la secuencia de nucleótidos que codifica para ROR1.
- 35
5. Anticuerpo según la reivindicación 2, en el que el dominio extracelular al que se une el anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos WNISSELNKDSYLTL.
- 40
6. Anticuerpo según la reivindicación 2, en el que el dominio intracelular al que se une el anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos NKSQKPYKIDSKQAS.
7. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además las regiones constantes C_H y C_L que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestra en la figura 3.
- 45
8. Secuencia de nucleótidos que codifica para un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 10, en la que las secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones V_H y V_L del anticuerpo son tal como se muestra en la figura 12 o figura 15.
- 50
10. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

11. Kit de partes que comprende:

- 5
- (i) un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica según la reivindicación 10;
 - (ii) aparato para administrar el anticuerpo o la composición farmacéutica; y
 - (iii) instrucciones para su uso.

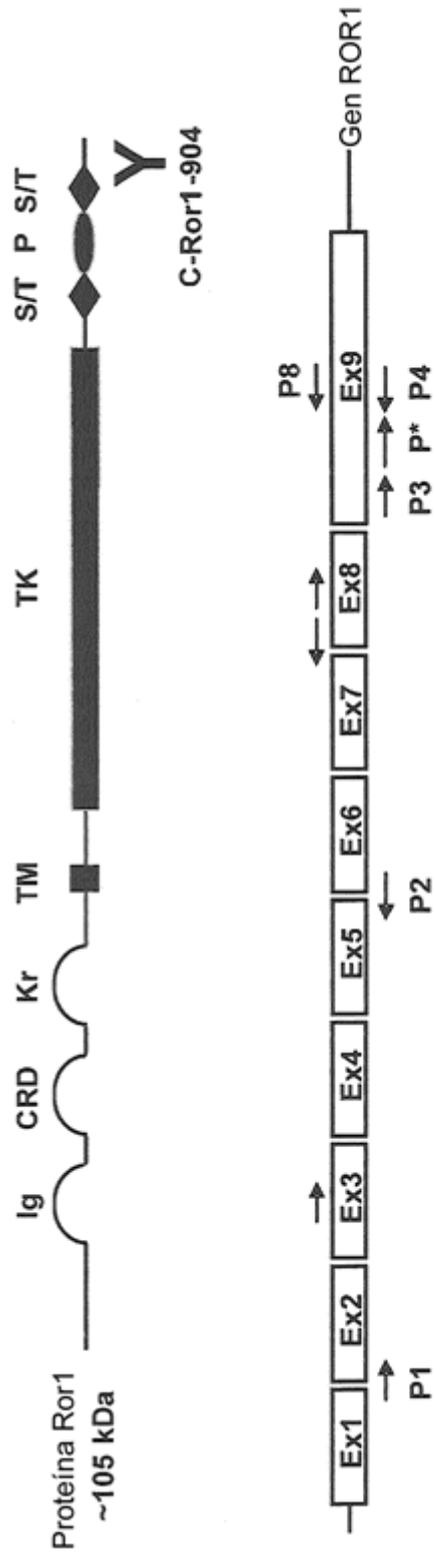


Figura 1

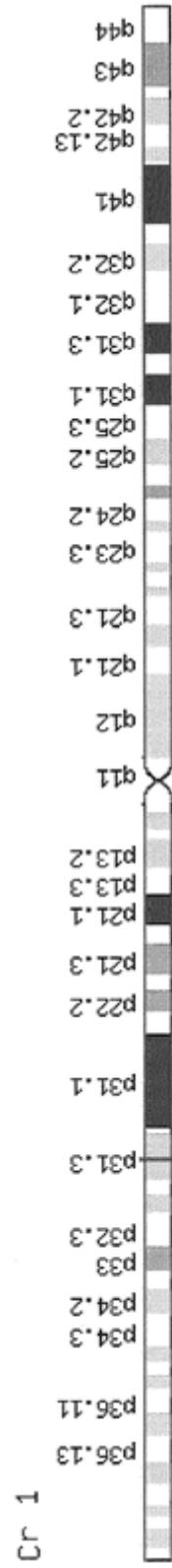


Figura 2

IgG1-CH

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

λ-CL

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP
SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Figura 3

ROR1-007-C08-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMAWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYADSVK
FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2

GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQDLSGWYPGYFDYWGQGTLTVVSS
FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-007-C08-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSDMGNYAVSWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGS
FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2

KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYTSSRTVFGGGTKLTVLG
FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-007-C08-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTATCGGGTGTAGTTGGAATGGCAGTAGGACGCACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCG
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
 GGACTGCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAAGATCTCAGTGGCTGGTACCCGGGGTACTTTGAC
 TACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

ROR1-007-C08-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCT
 CTGGAAGCAGCTCCGACATGGGGAATTATGCGGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGGCCC
 CAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAA
 GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTACTGCTGC
 AGCTCATATAACAAGCAGTCGCACTGTGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

Figura 5

ROR1-008-A03-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGDSTYYADSVK
 FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
 GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGDTSGYGPHWGQGTLVTVSS
 FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-008-A03-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYYVYWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSK
 FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2
 SGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDDTLSVWFVFGGGTKLTVLG
 FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-008-A03-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAGGTATTACTGGTAGTGGTGATAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
 CTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
 GGACACTGCCGTGATTACTGTGCGACGGGGGAGATACTAGTGGGTATGGACCCCACTGGGGCCA
 AGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

ROR1-008-A03-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGTT
 CTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCC
 CAAACTCCTCATCTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG
 TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTC
 AATCCTACGACACCCCTGAGTGTTGTGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

Figura 8

ROR1-008-D04-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**FSDYYMSWIRQAPG**KGLEWV**AIISYDGSNEYADSVKGR**
 FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
 FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ATSSGDGGWEDWGPPYYYYGMDV**WGQGTLLTVSS
 FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-008-D04-VL

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CTGSSSNLGAGYAVH**WYQQLPGTAPKLLIY**GNTNRPS**GVPDRFSGS
 FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2
 KSGTSASLAISGLRSEADYY**CAAWDDSLRGPV**FGGGTKLTVLG
 FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-008-D04-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
 GGACTGCGGTGTATTACTGTGCAACATCCTCGGGGGATGGGGGATGGGAGGATTGGGGCCCACC
 TTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGTTACTGGTCACCGTGAGCTCA

ROR1-008-D04-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCA
 CTGGGAGCAGCTCCAACCTCGGGGACAGGTTATGCTGTACACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGG
 CCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACACCAATCGGCCCTCAGGGGTCCTGACCGATTCTCTGGCTCC
 AAGTCTGGCACCTCAGCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACT
 GTGCGGCATGGGATGACAGCCTGAGAGGTCCGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCTAG
 GT

Figura 9

ROR1-008-G04-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSSYAMSWWRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGR
 FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
 FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSWELIGYDAFDLWGQGTLVTVSS
 FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-008-G04-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYYVWYQQLPGTAPKLLIYGDSNRPSGVPDRFSGSK
 FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2
 SGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVLG
 FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-008-G04-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC
 ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
 ACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGATTCTTGGGAGCTAATAGGGTATGATGCTTTTGATCTCTGGG
 GCCAAGGTACTGCTCACCCTGAGCTCA

ROR1-008-G04-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTT
 CTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCC
 CAAACTCCTCATCTATGGTGACAGTAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG
 TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCG
 GAACATGGGATAGCAGCCTGAGTGCTTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

Figura 10

ROR1-008-H06-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHEMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK
 FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
 GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEYILGAYYFDYWGQGTLVTVSS
 FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-008-H06-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIESSTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSK
 FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2
 SGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSPVLVFGGGTKLTVLG
 FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-008-H06-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAATCATGAAATGAATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
 GTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
 GGACACTGCCGTGATTACTGTGCGAGAGAAGAATATACGATTTGGGAGCCTACTACTTTGACTTC
 TGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

ROR1-008-H06-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGT
 CTGGAAGCAGCTCCAACATCGAAAGTAGTACTGTAACTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGGCCC
 CCAAACCTCATCTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCAA
 GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGC
 CAGTCATATGACAGTAGCCTGAGTCCTCTTGTGCTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAG
 GT

Figura 11

ROR1-009-G11-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**FSSYSMNWVRQAPG**KGLEWV**SSISSSSSYIYYADSVKG**
 FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC**ARRGTTFDY**WGQGT LTVSS
 FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-009-G11-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS**CTGSNSNLGAPYDVH**WYQQLPGTAPKLLIY**SDNQRPS**GVPDRFSGS
 FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2
 KSGTSASLAISGLRSEDEADYY**CGTWDDSLSGWV**FGGGTKLTVLG
 FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-009-G11-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGA
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
 GACTGCGGTGATTACTGTGCGAGAAGGGGGACGACTTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACTG
 GTCACCGTGAGCTCA

ROR1-009-G11-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGGCTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCA
 CTGGGAGCAACTCCAACCTCGGGGCACCTTATGATGTACTGTTATCAGCAGCTCCAGGAACGGC
 CCCCAACTCCTCATCTATAGTGATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC
 AAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTACT
 GTGGAACATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAG
 GT

Figura 13

ROR1-010-D05-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**FSSYAMNWRQAPG**KGLEWV**SGVSWNGSRTHYADSVK**
 FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ASNAPFDP**WGQGT LVTVSS
 FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-010-D05-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS**CSGSSSNIGSNYYVY**WYQQLPGTAPKLLIY**DNNKRPS**GVPDRFSGSK
 FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2
 SGTSASLAISGLRSEDEADYY**CQSYDSSLSAVV**FGGGTKLTVLG
 FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-010-D05-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTATCGGGTGTTAGTTGGAATGGCAGTAGGACGCACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCG
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
 GGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGTAACGCACCCTTCGACCCTGGGGCCAAGGTACACTGGTC
 ACCGTGAGCTCA

ROR1-010-D05-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTT
 CTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCC
 CAAACTCCTCATCTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG
 TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCC
 AGTCCTATGACAGCAGCCTGAGTGCTGTGGTATTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

Figura 14

ROR1-010-D06-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVK
 FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
 GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSAGSMGYFDYWGQGTLVTVSS
 FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-010-D06-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGS
 FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2
 KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLG
 FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-010-D06-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGAGACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
 GACTGCGGTGATTACTGTGCGAGAGGCCGGTCCGGCTGGTAGCATGGGCTACTTTGACTACTGGG
 GCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

ROR1-010-D06-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCA
 CTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGG
 CCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTC
 CAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTAC
 TGTGCAGCATGGGATGACAGTCTGAATGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCTCTA
 GGT

Figura 15

ROR1-011-F01-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**FSDYYMSWVRQAPG**KGLEWV**AIISYDGNENYYADSVKG**
 FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AREIDIDYADDAYDI**WGQGTLTVSS
 FrH3 CDRH3 FrH4

ROR1-011-F01-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS**CTGSSSNIGAGYDVL**WYQQLSGTAPKLLIY**SNNQRPS**GVPDRFSGS
 FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2
 KSGTSASLAISGLRSEDEADYY**CASWDDSLSGPV**FGGGTKLTVLG
 FrL3 CDRL3 FrL4

ROR1-011-F01-VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGT
 GGAGTGGGTCTCAACTGTTAGTGCTGGTGGTGGTAGCACATTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
 GAACTGCCGTGATTACTGTGCGAGAGGCCAAGATGGGGCCAATGACTACTGGGGCCAAGGTACA
 CTGGTCACCGTGAGCTCA

ROR1-011-F01-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCA
 CTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTA CTCTGGTATCAGCAGCTCTCAGGAACGGC
 CCCCAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC
 AAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTACT
 GTGCATCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTCCGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAG
 GT

Figura 16

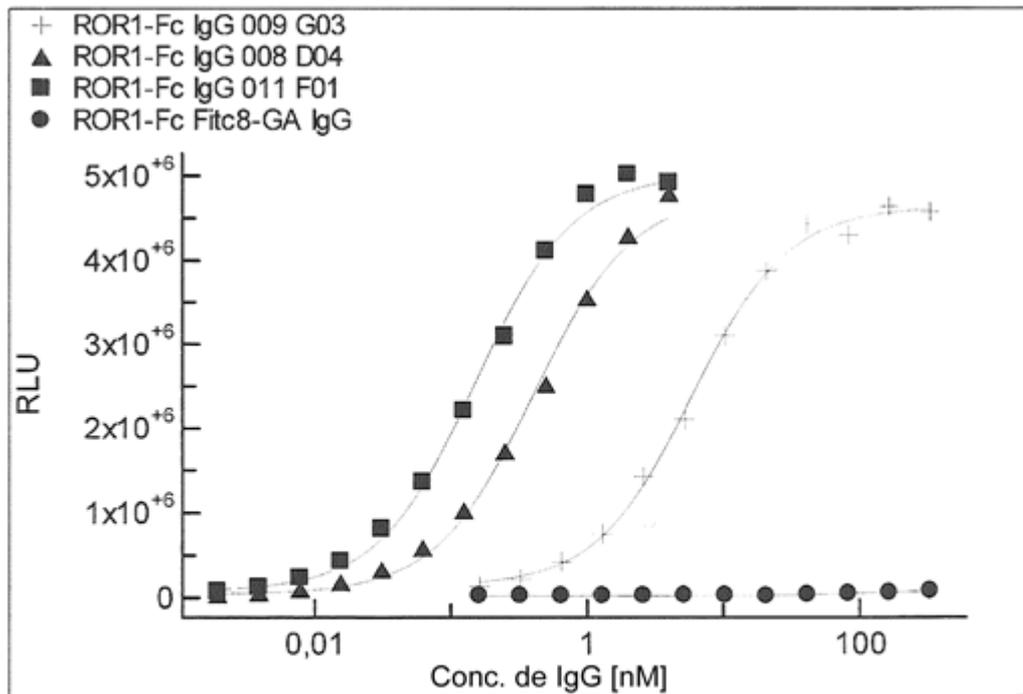
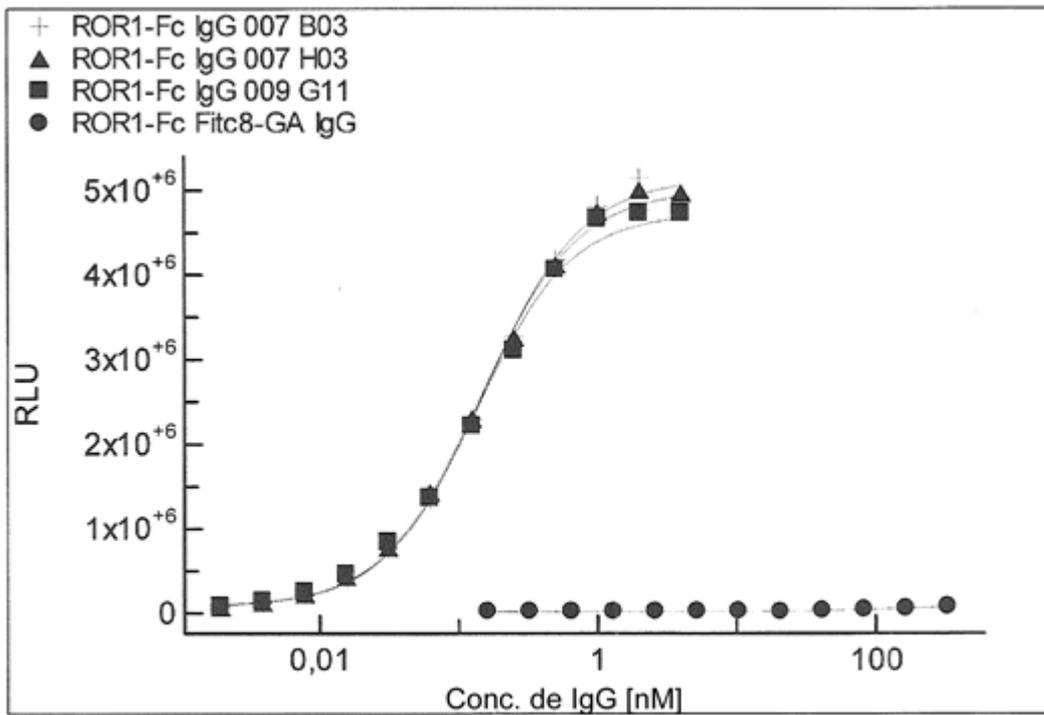


Figura 17

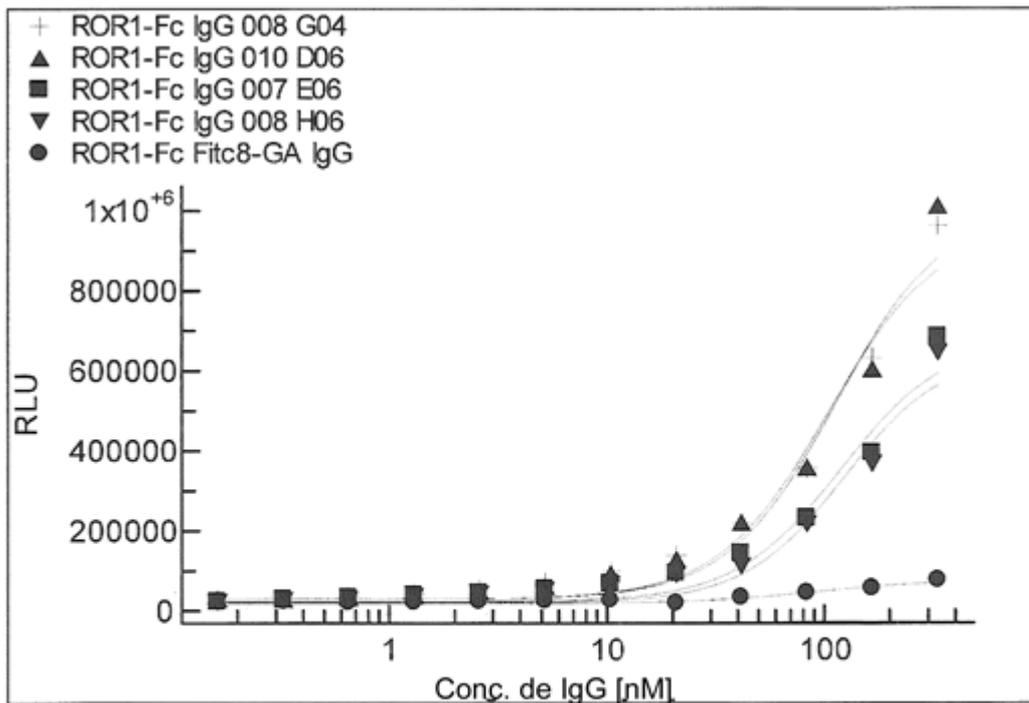
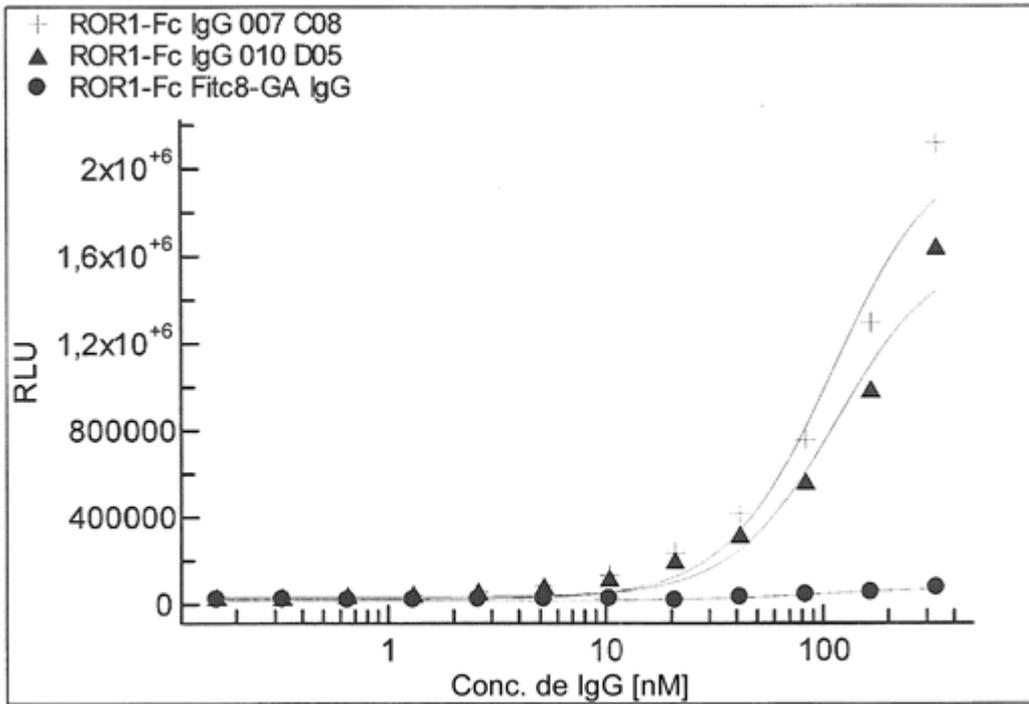


Figura 17 (cont.)

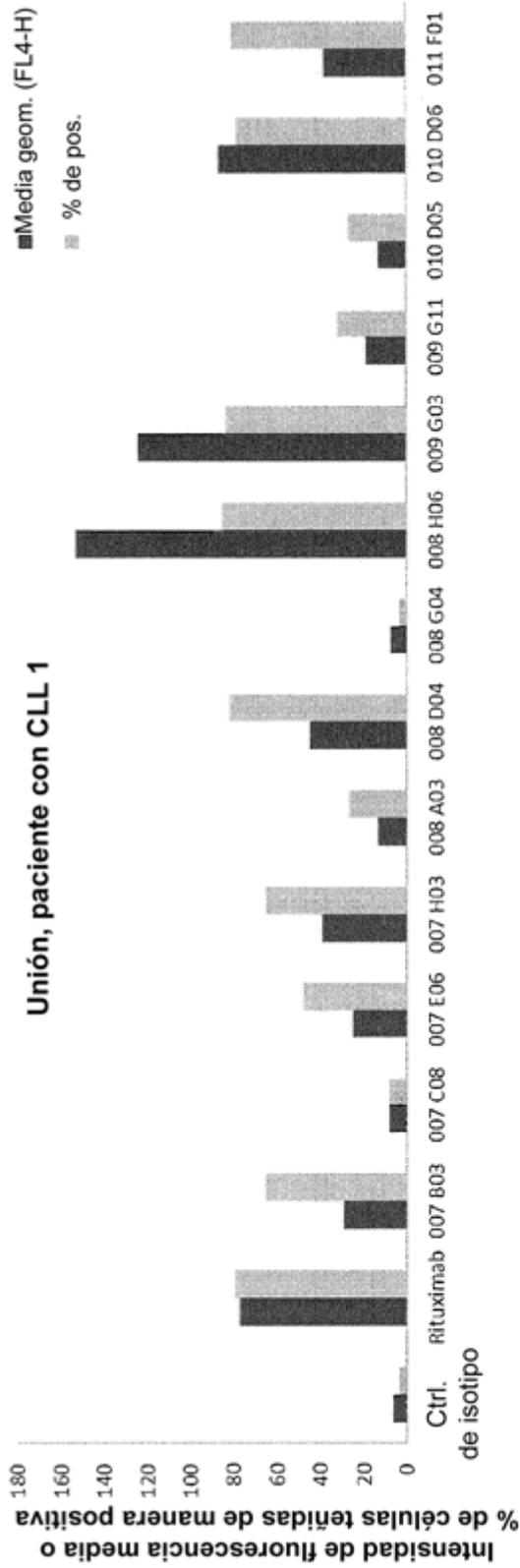


Figura 18

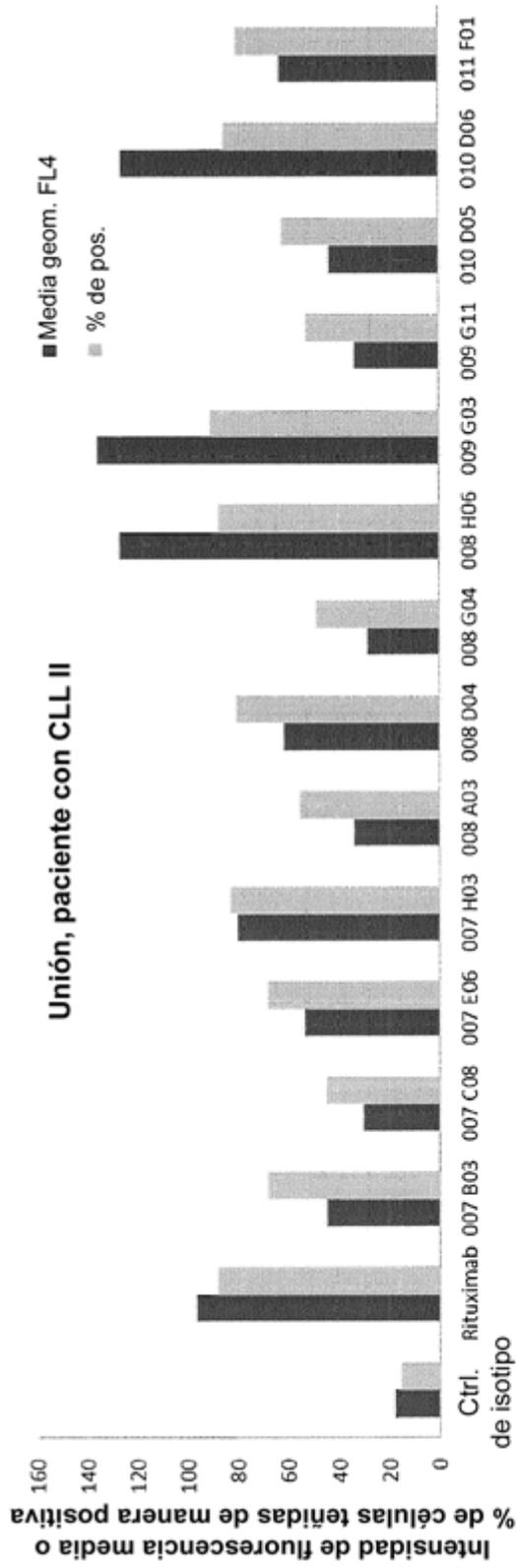


Figura 18 (cont.)

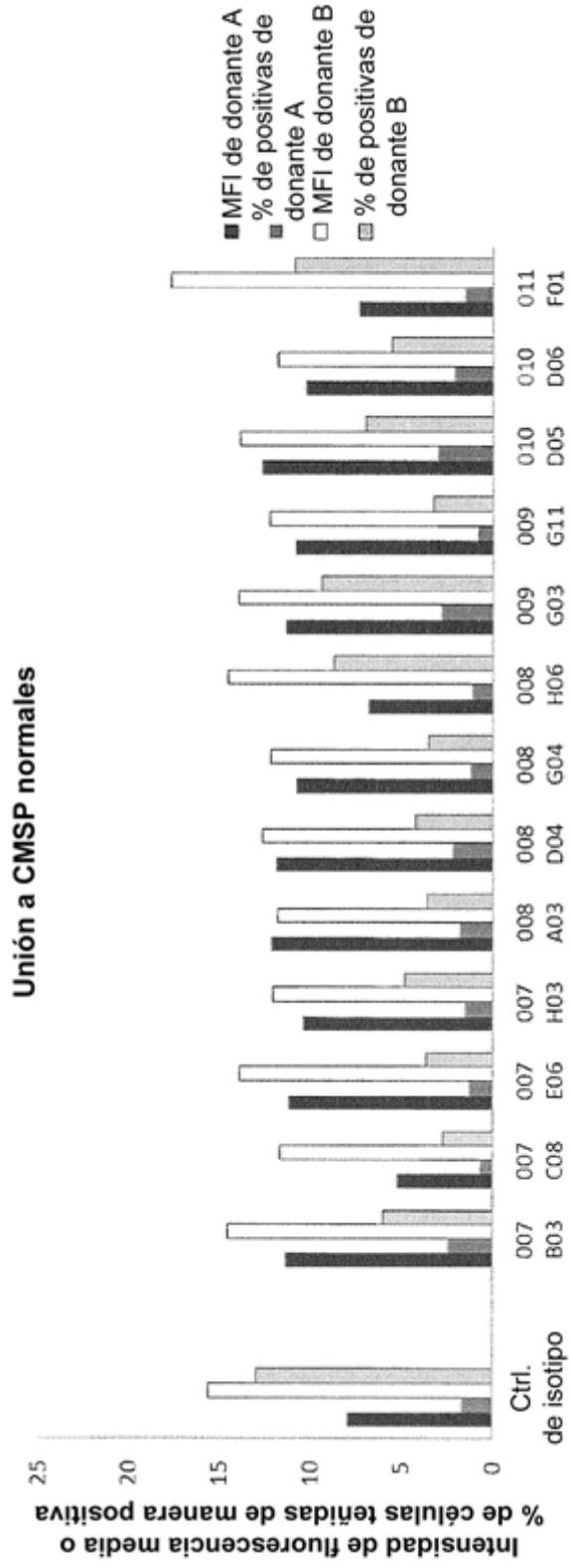


Figura 19

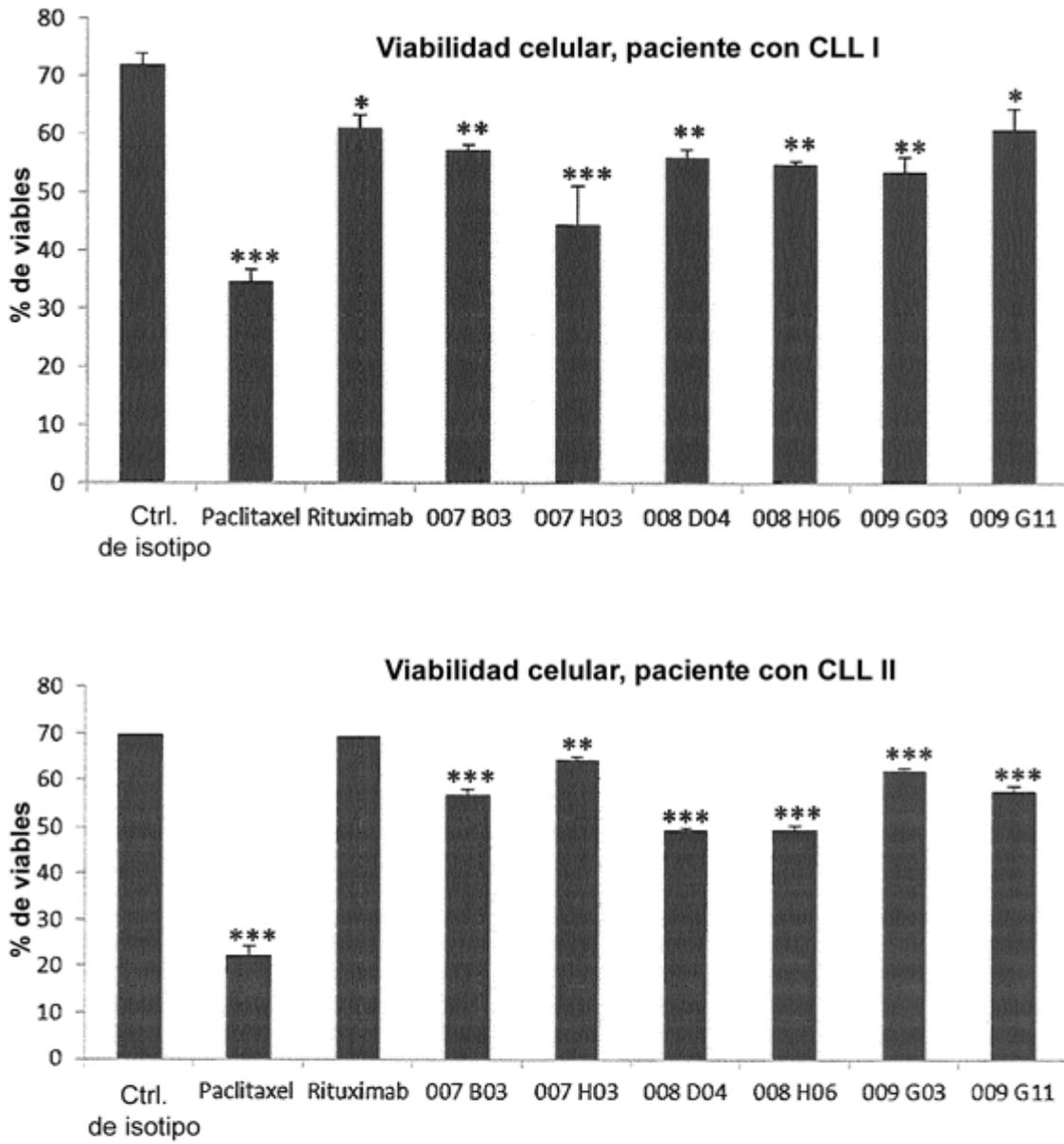


Figura 20

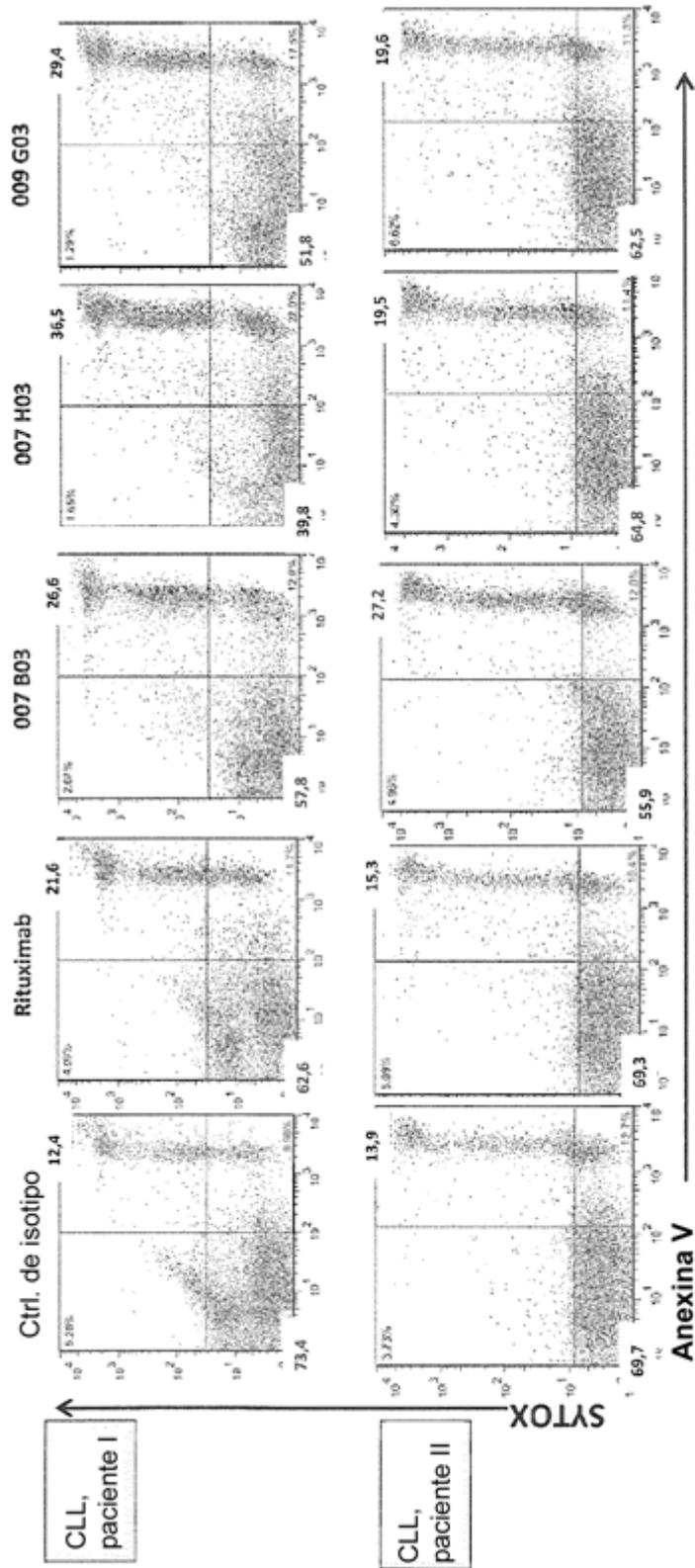


Figura 21

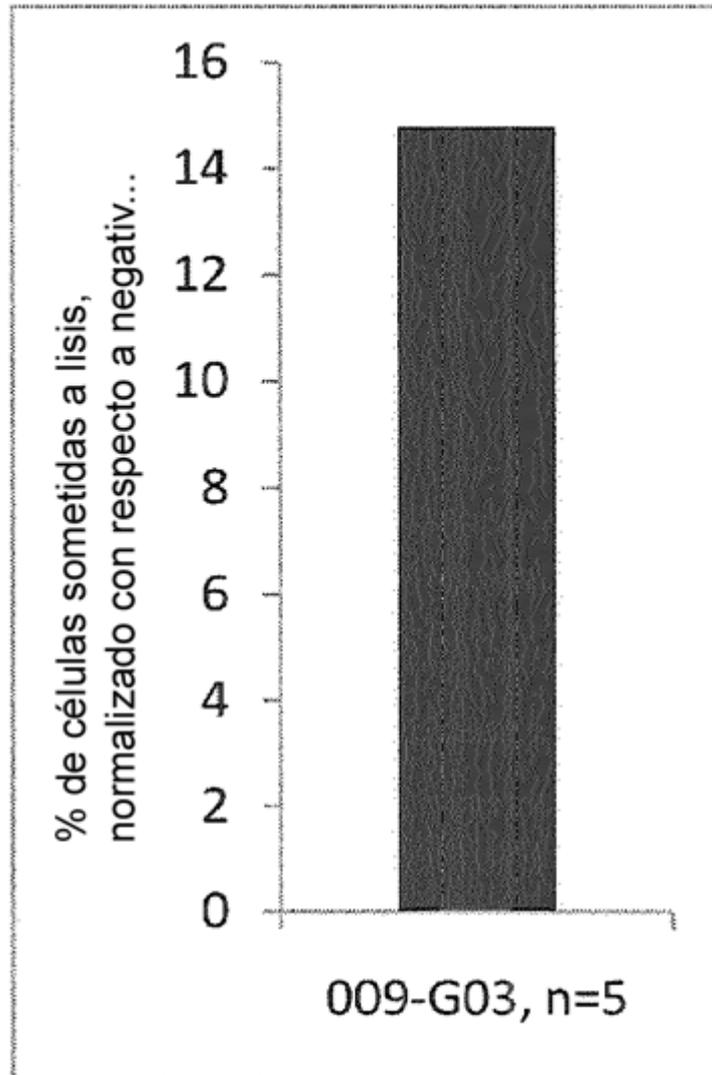


Figura 22

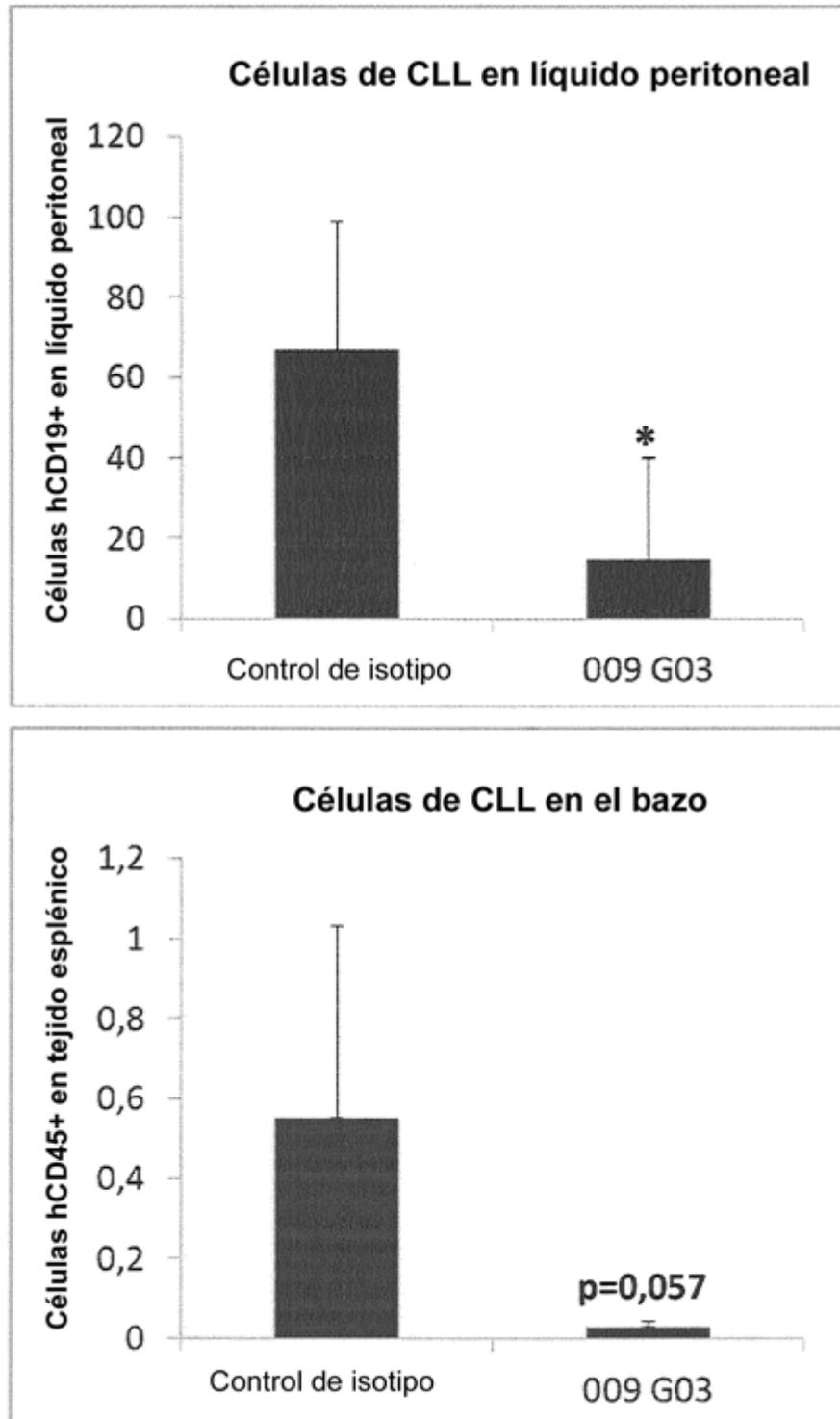


Figura 23

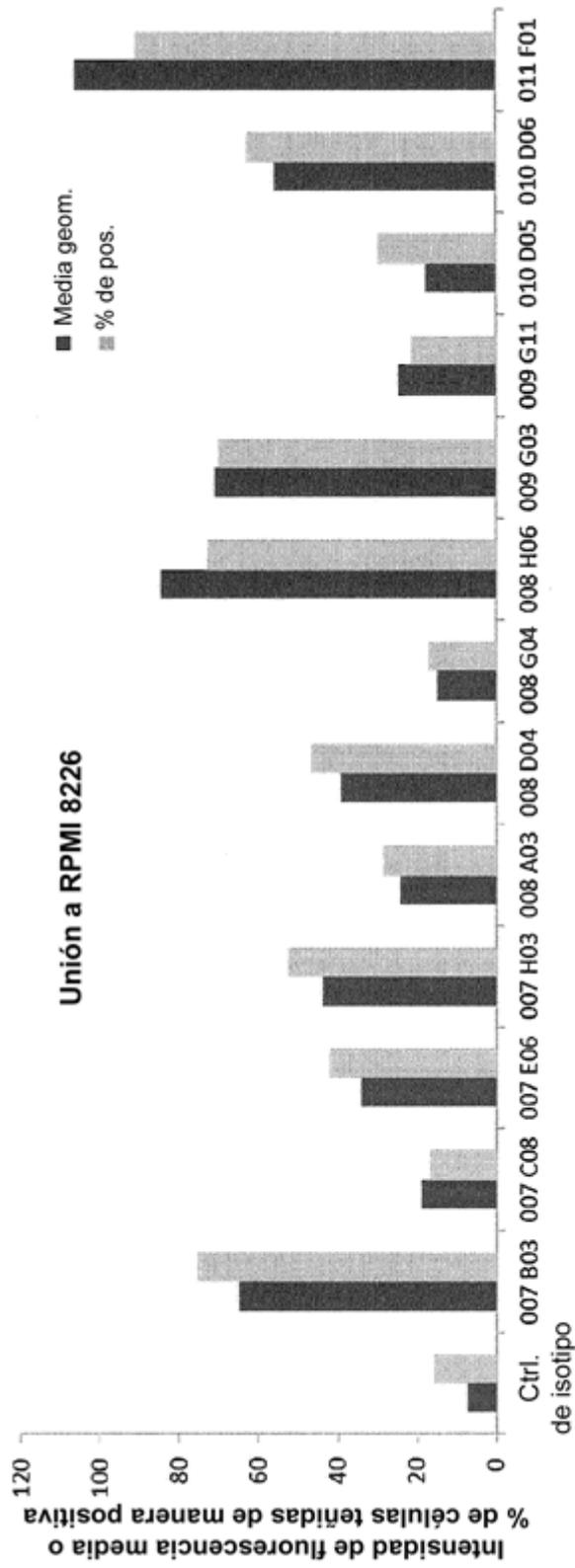


Figura 24

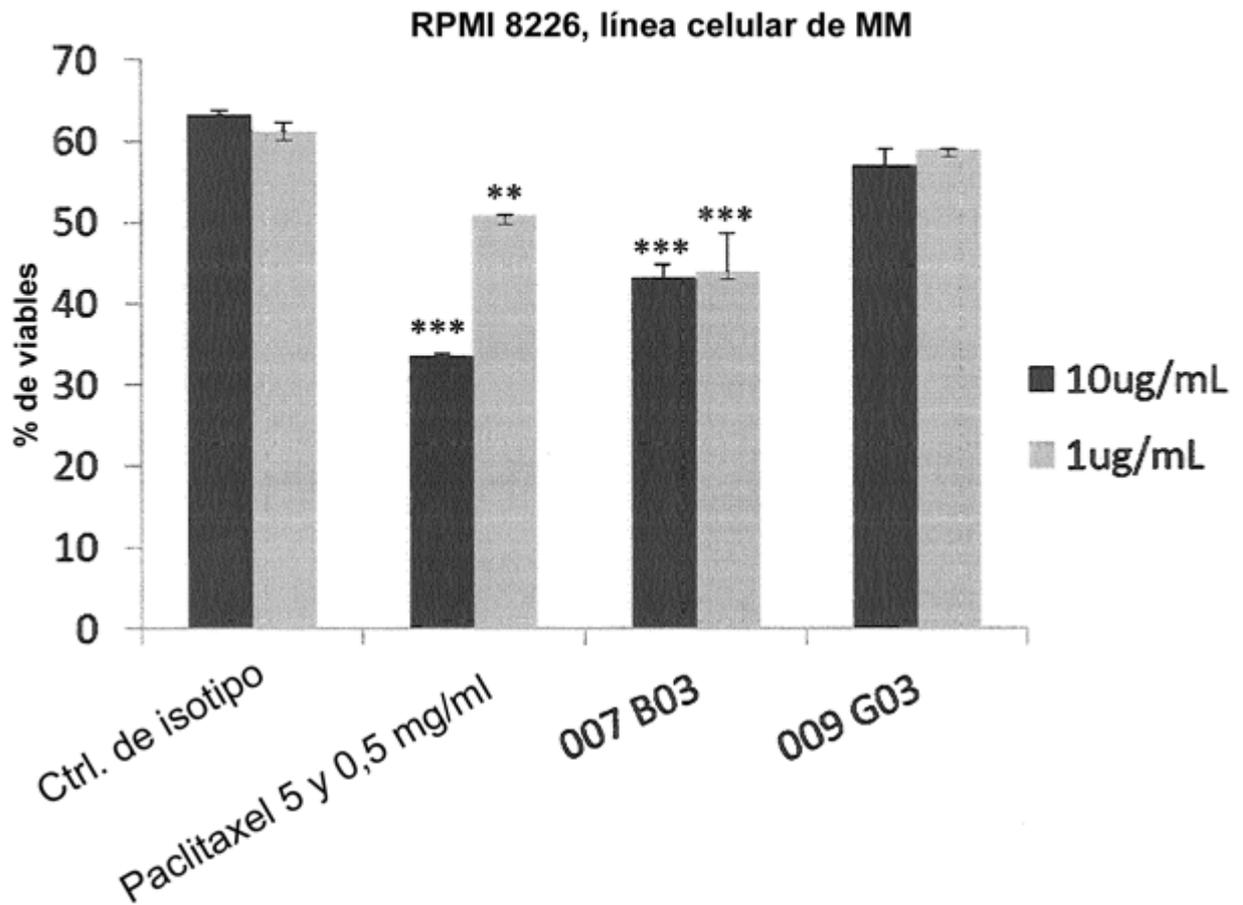


Figura 25

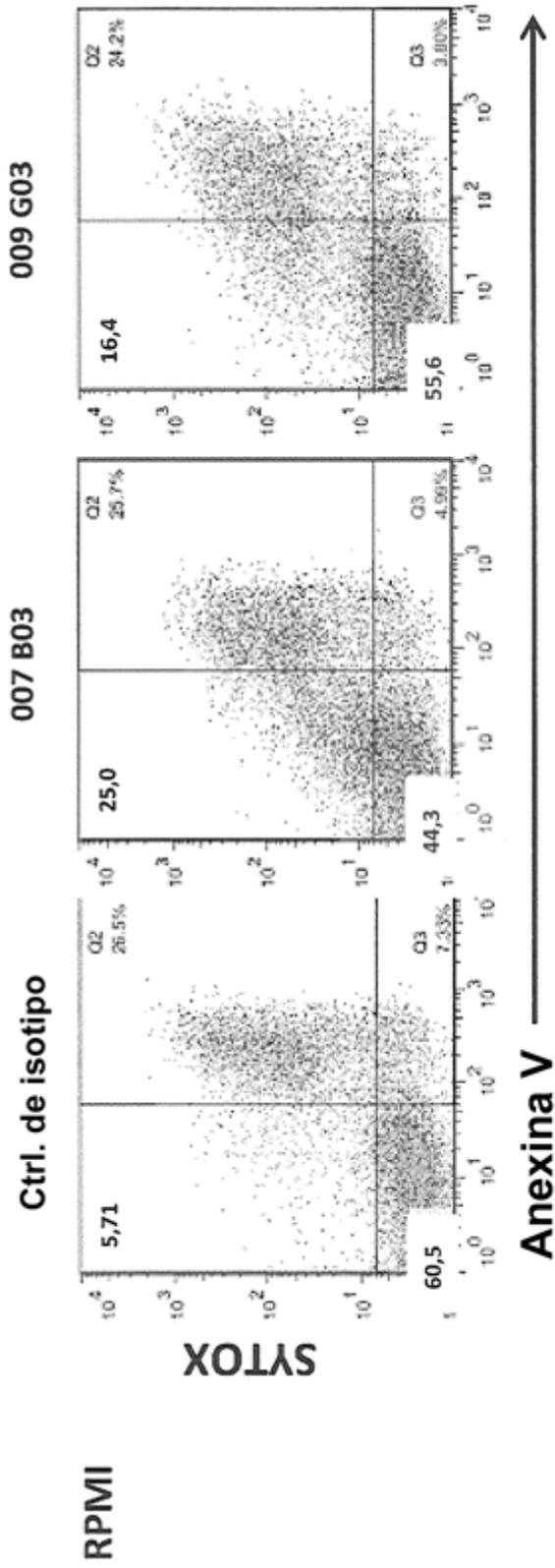
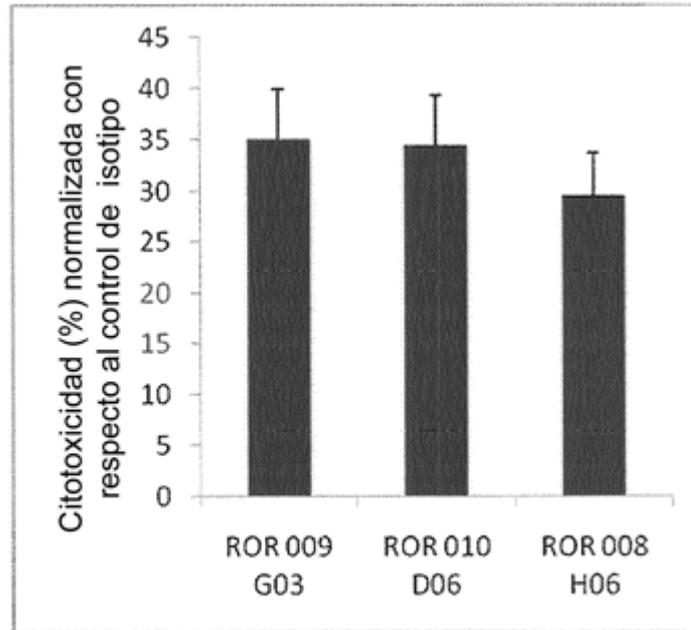


Figura 26

A



B

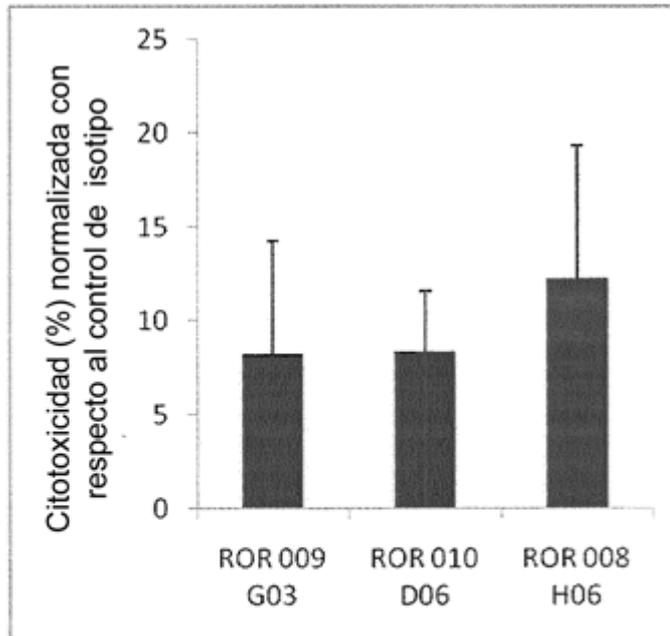


Figura 27

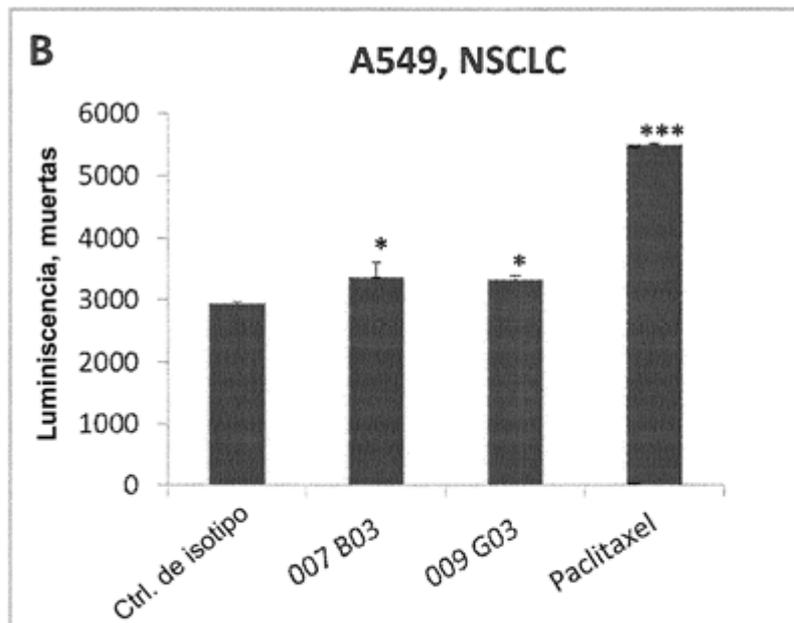
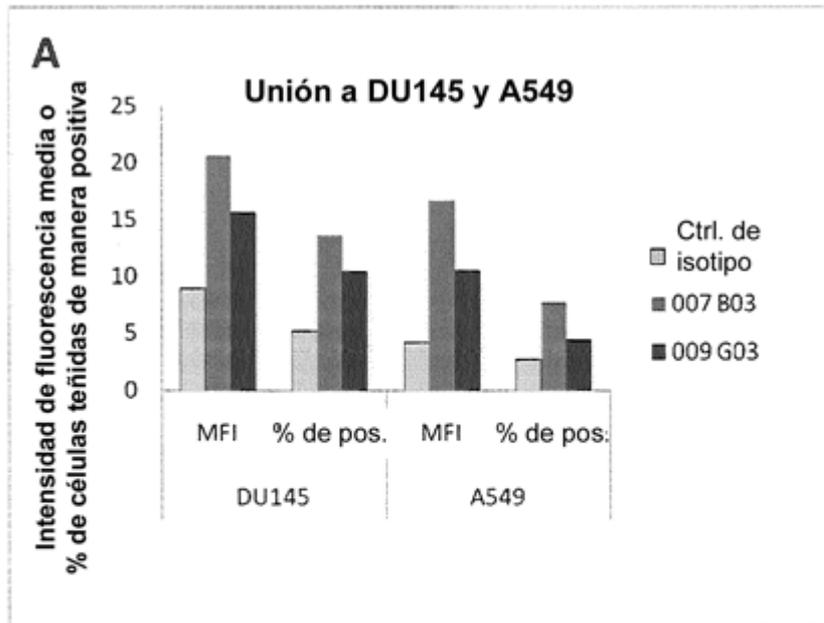


Figura 28

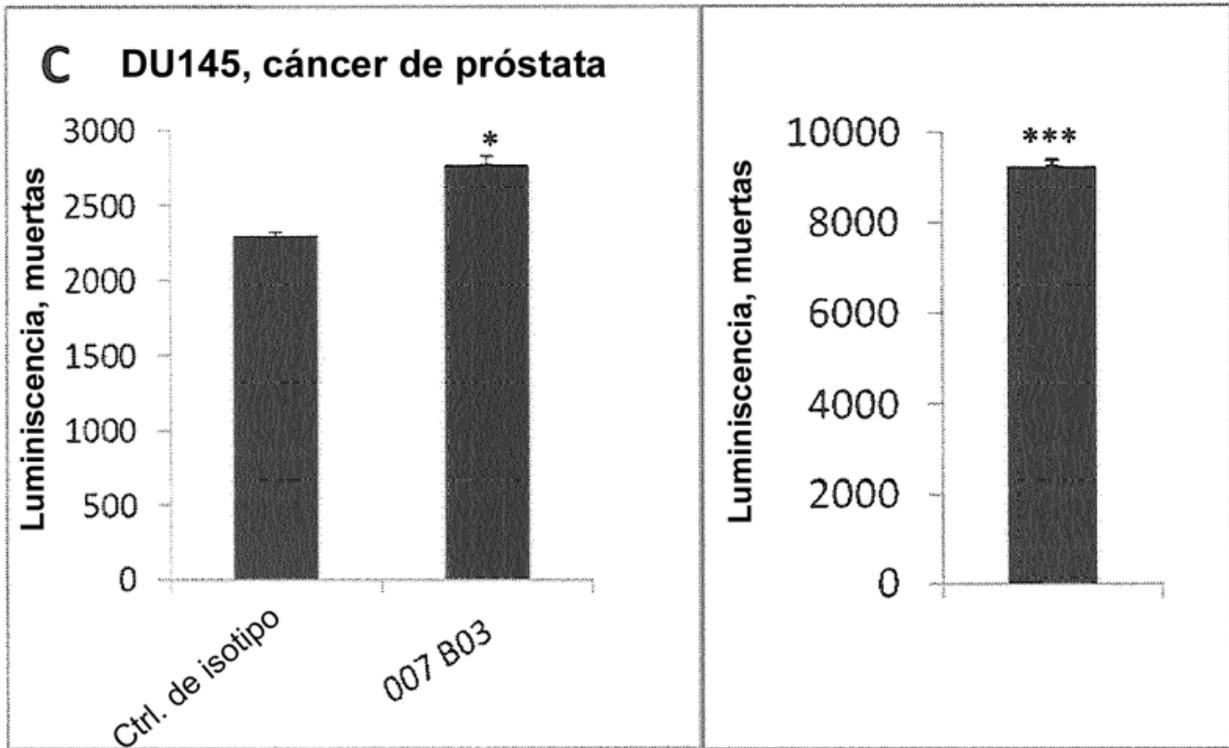
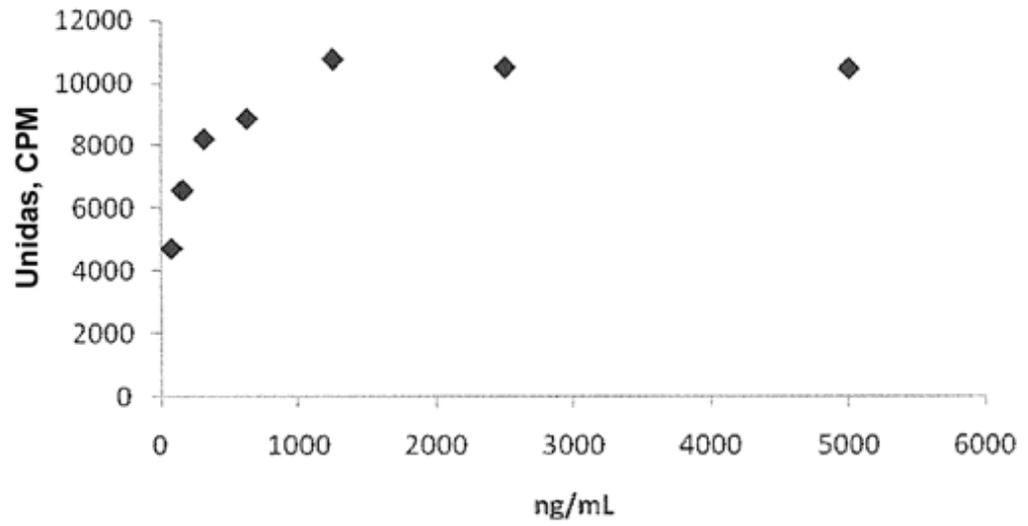


Figura 28 (cont.)

A



B

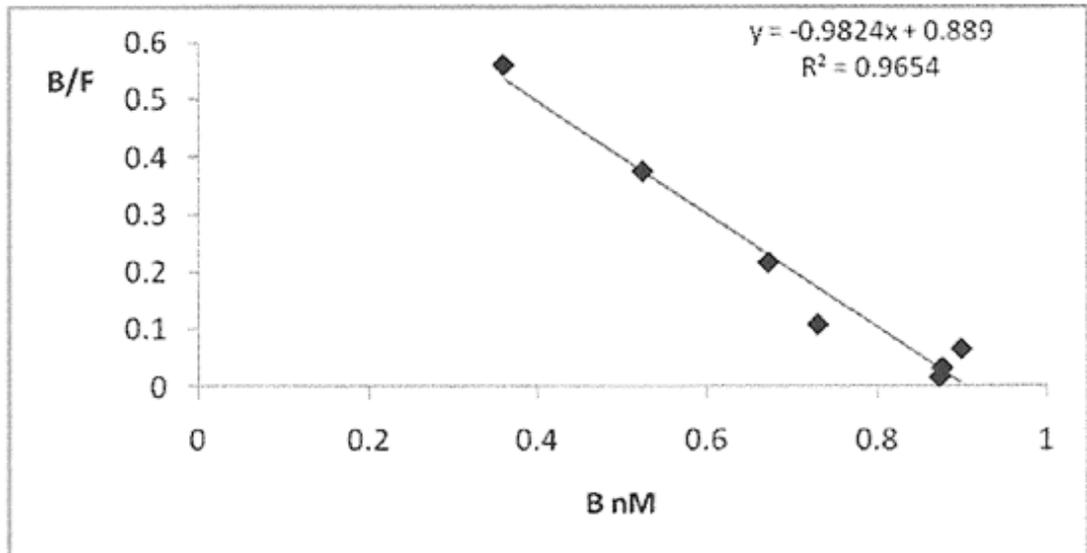
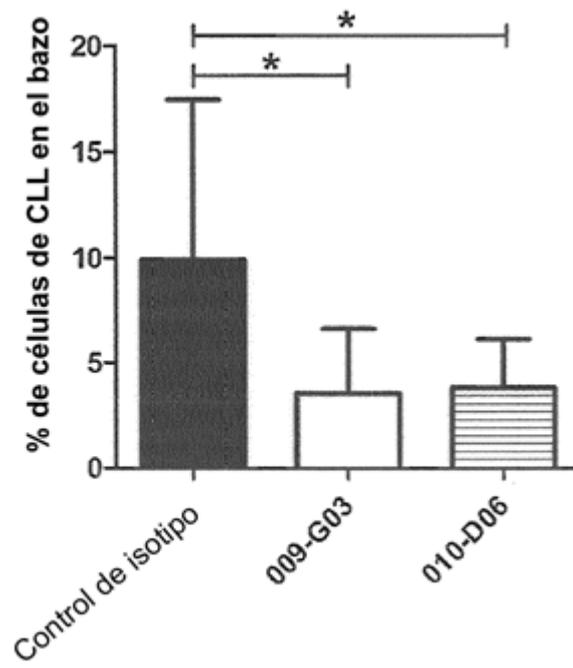


Figura 29

A



B

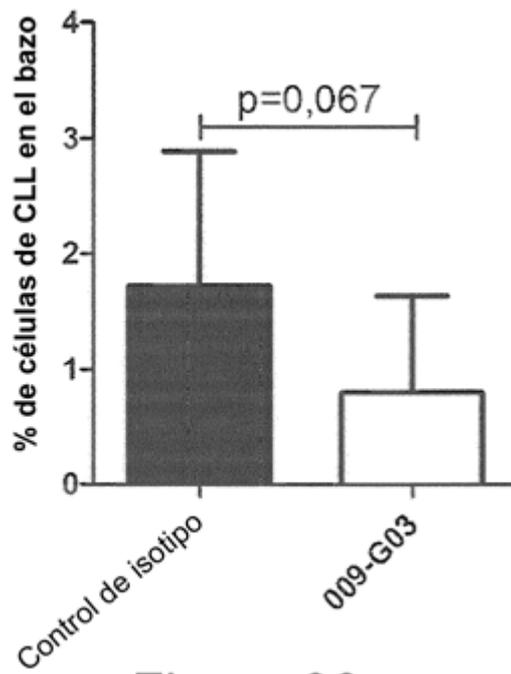
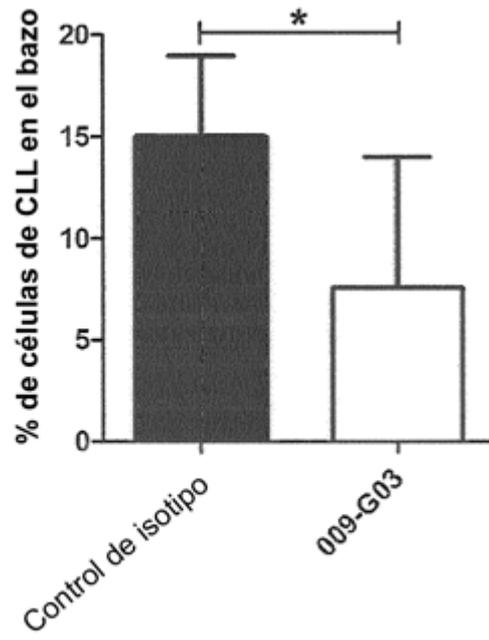


Figura 30

C



D

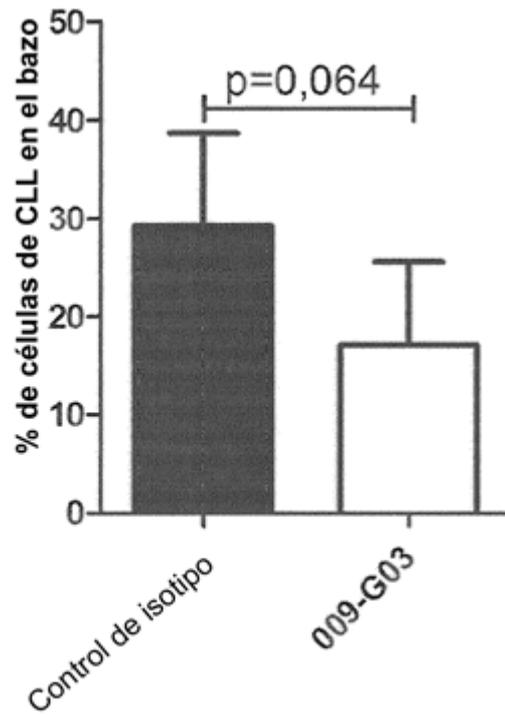


Figura 30 (cont.)