

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 970**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/US2011/062670**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12075158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11791733 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2646469**

54 Título: **Anticuerpos contra ROR1 de conejo/ser humano quiméricos**

30 Prioridad:

01.12.2010 US 418550 P

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

07.03.2018

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer, National Institutes
of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325,
MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**RADER, CHRISTOPH y
YANG, JIAHUI**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 657 970 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 de conejo/ser humano quiméricos

Antecedentes de la invención

5 Se han desarrollado diagnósticos y terapias con anticuerpos para su uso en el tratamiento de una amplia gama de estados incluyendo enfermedades o trastornos autoinmunitarios, enfermedades infecciosas y cánceres. Tales terapias son útiles pero también pueden estar asociadas con inmunogenicidad no deseada y pueden dañar células y tejidos sanos.

10 La leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) y el linfoma de células del manto (LCM) son dos tumores malignos de células B incurables con una incidencia combinada de nuevos casos que supera los 18.000 pacientes al año sólo en los Estados Unidos. Se han desarrollado terapias con anticuerpos para tumores malignos de células B, que incluyen rituximab, un anticuerpo monoclonal de ratón/ser humano quimérico (AcM), alemtuzumab, un AcM humanizado, y ofatumumab, un AcM humano. Sin embargo, los antígenos diana para estos tres fármacos (CD20, CD52 y CD20, respectivamente) se expresan no solo en células B malignas sino también en células B normales, y CD52 se expresa de manera ubicua en una variedad de células normales del sistema inmunitario. Por tanto, la inmunosupresión puede ser un problema con estas terapias con anticuerpos. Actualmente en los Estados Unidos y Europa, no existe ningún anticuerpo terapéutico comercial que reconozca específicamente un antígeno presente en células B malignas, pero no en células B normales.

15 Existe el deseo de anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico adicionales que tengan buena eficacia y que presenten mínima unión y/o daño a células no enfermas.

20 **Breve resumen de la invención**

La invención proporciona un anticuerpo aislado con especificidad por el dominio extracelular del receptor huérfano 1 similar a tirosina cinasa receptora (ROR1), que se expresa selectivamente en la superficie de células malignas, incluyendo tumores de células B y otros cánceres.

En particular, la invención proporciona las siguientes realizaciones tal como se definen en los puntos 1-20:

25 1. Un anticuerpo aislado que tiene especificidad por el dominio extracelular del receptor huérfano 1 similar a tirosina cinasa receptora (ROR1) humano, que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, y en el que las seis CDR se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) SEQ ID NO: 31-33 y SEQ ID NO: 40-42;

(b) SEQ ID NO: 34-36 y SEQ ID NO: 43-45; y

30 (c) SEQ ID NO: 37-39 y SEQ ID NO: 46-48.

2. El anticuerpo según el punto 1, en el que el anticuerpo comprende:

(a) un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

35 (b) un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o

40 (c) un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

3. El anticuerpo según el punto 2, en el que

(a) el dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,

45 (b) el dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o

(c) el dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

4. El anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1-3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

5. El anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1-4, en el que el anticuerpo se conjuga con una molécula sintética.
6. El anticuerpo según el punto 5, en el que el anticuerpo es un cuerpo T y la molécula sintética comprende una región transmembrana y un dominio de señalización de receptor de células T (TCR) intracelular.
- 5 7. El anticuerpo según el punto 5, en el que la molécula sintética es un marcador, un agente citotóxico, un radioisótopo terapéutico o un liposoma.
8. El anticuerpo según el punto 7, en el que el agente citotóxico es una toxina.
9. El anticuerpo según el punto 7, en el que la toxina es un fragmento de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE).
- 10 10. El anticuerpo según el punto 9, en el que la toxina es PE38.
11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1-10 y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. Un kit que comprende el anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1-10.
13. El kit según el punto 12, que comprende además uno o más tampones de inmunoensayo.
- 15 14. Uso del anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1-10 en la preparación de un medicamento para destruir o inhibir el crecimiento de células que expresan ROR1 en un sujeto.
15. Uso del anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1-10 en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o un estado asociado con la expresión elevada de ROR1 en un sujeto.
- 20 16. Un método *in vitro* de detección de un nivel alterado de ROR1 en una muestra de prueba, método que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de prueba obtenida de un sujeto con el anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1-10;
- (b) determinar el nivel de ROR1 en la muestra de prueba; y
- (c) comparar el nivel de ROR1 en la muestra de prueba con un nivel de control de ROR1 para determinar de ese modo si el nivel de ROR1 en la muestra de prueba está alterado con relación al nivel de control de ROR1.
- 25 17. Método según el punto 16, en el que el nivel de ROR1 en la muestra de prueba del sujeto que es mayor que el nivel de control es indicativo de una enfermedad o un estado asociado con la expresión elevada de ROR1 en el sujeto.
- 30 18. El uso según el punto 16 o método según el punto 17, en el que la enfermedad o el estado asociado con la expresión elevada de ROR1 es un cáncer de células B, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer colorrectal o cáncer de mama, preferiblemente la enfermedad o el estado es leucemia linfocítica de células B (LLC-B) o linfoma de células del manto (LCM).
- 35 19. Uso del anticuerpo según el punto 7 en la preparación de un medicamento para detectar un tumor que expresa ROR1, en el que el medicamento es adecuado para la administración a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener un tumor que expresa ROR1, para la obtención de imágenes del sujeto para una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado, en el que la densidad o concentración es con relación a (i) el fondo en tejido proximal o (ii) la densidad o concentración detectada previamente en la misma región del sujeto, de tal manera que la existencia de una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado es una indicación de la presencia de un tumor que expresa ROR1 en el sujeto.
- 40 20. Uso del anticuerpo según el punto 7 en la preparación de un medicamento para detectar un tumor de células B que expresa ROR1, en el que el medicamento es adecuado para la administración a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener un tumor de células B, para la obtención de imágenes del sujeto para una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado, en el que la densidad o concentración es con relación a (i) el fondo en tejido proximal o (ii) la densidad o concentración detectada previamente en la misma región del sujeto, de tal manera que la existencia de una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado es una indicación de la presencia de un tumor de células B que expresa ROR1 en el sujeto; preferiblemente el tumor de células B que expresa ROR1 es una leucemia linfocítica de células B (LLC-B) o un tumor de linfoma de células del manto (LCM). A continuación, se define la invención mediante las reivindicaciones adjuntas.
- 45 50 En particular, la invención proporciona un anticuerpo aislado que tiene especificidad por ROR1 humano y que tiene

(a) una cadena ligera con una identidad de al menos el 90% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5, (b) una cadena pesada con una identidad de al menos el 90% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6, o (c) tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b).

5 La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo aislado que tiene especificidad por ROR1 humano y que tiene (a) una cadena ligera con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de SEQ ID NO: 1, (b) una cadena pesada con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de SEQ ID NO: 2; o (c) tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b).

10 La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo aislado que tiene especificidad por ROR1 humano y que tiene (a) una cadena ligera con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de SEQ ID NO: 3, (b) una cadena pesada con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de SEQ ID NO: 4; o (c) tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b).

15 La invención proporciona además un anticuerpo aislado que tiene especificidad por ROR1 humano y que tiene (a) una cadena ligera con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de SEQ ID NO: 5, (b) una cadena pesada con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de SEQ ID NO: 6; o (c) tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b).

20 La invención también proporciona un anticuerpo aislado que tiene especificidad por ROR1 humano y que tiene al menos una CDR que incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31-48. En otras realizaciones, el anticuerpo aislado puede incluir una o más variantes de las CDR anteriores con 1, 2 ó 3 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Además, en el presente documento se da a conocer el uso de un anticuerpo aislado de la invención o una composición farmacéutica del mismo para destruir o inhibir el crecimiento de células que expresan ROR1 en un sujeto, así como para tratar una enfermedad o un estado asociado con la expresión elevada de ROR1 (por ejemplo, un tumor maligno de células B, carcinoma de células renales, cáncer de colon o cáncer de mama), administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo aislado de la invención o una composición farmacéutica del mismo a un sujeto que lo necesita, por tanto destruyendo o inhibiendo el crecimiento de células que expresan ROR1 en el sujeto, o tratando la enfermedad o el estado asociado con la expresión elevada de ROR1 en el sujeto.

30 Los anticuerpos y las composiciones de la invención también pueden usarse en métodos de diagnóstico para detectar niveles alterados de ROR1, por ejemplo, en una muestra o en un sujeto, o tumores que expresan ROR1 en un sujeto.

Breve descripción del/de los dibujo(s)

35 La figura 1 es una representación esquemática de ocho proteínas de fusión de Fc recombinantes que tienen diferentes composiciones de los dominios extracelulares similares a inmunoglobulina (Ig), Frizzled y Kringle de ROR1. Se representan los dominios de Ig como óvalos (en color negro), se representan los dominios Frizzled como triángulos (en color negro), y se representan los dominios Kringle como círculos (en color negro).

40 La figura 2 es una lista de las secuencias de aminoácidos correspondientes a las cadenas ligeras de región variable R11, R12 e Y31 (V_{κ} y V_{λ}) (SEQ ID NO: 1, 3 y 5) y cadena pesadas de región variable (V_H) (SEQ ID NO: 2, 4 y 6), que identifican las regiones de marco de cadena ligera FR1-FR4 (SEQ ID NO: 7-10, 11-14, y 15-18), las regiones de determinación de complementariedad de cadena ligera CDR1-CDR3 (SEQ ID NO: 31-33, 34-36, y 37-39), las regiones de marco de cadena pesada FR1-FR4 (SEQ ID NO: 19-22, 23-26, y 27-30) y CDR1-CDR3 de cadena pesada (SEQ ID NO: 40-42, 43-45, y 46-48).

45 La figura 3A es un gráfico que representa los resultados de estudios de ELISA, proporcionando datos de absorbancia para la unión de R11, R12 e Y31 de IgG1 de conejo/ser humano quiméricos, y P14 como control negativo, frente a ROR1 humano inmovilizado (Fc-hROR1), ROR1 de ratón (Fc-mROR1) y ROR2 humano (hROR2-Fc). Las columnas indican valores medios, y las barras de error indican valores de desviación estándar de triplicados.

50 La figura 3B es un gráfico que representa los resultados de estudios de ELISA que mapean los epítomos de R11, R12 e Y31 de IgG1, y P14 como control negativo con cinco proteínas de fusión de Fc inmovilizadas que consistían en sólo uno o dos dominios extracelulares de ROR1 humano : Fc-hROR1ig (ig), Fc-hROR1fz (fz), Fc-hROR1kr (kr), Fc-hROR1ig+fz (ig+fz) y Fc-hROR1 fz+kr (fz+kr). Las columnas indican valores medios, y las barras de error indican valores de desviación estándar de triplicados.

55 La figura 4 es una serie de gráficos que representan los resultados de análisis de unión mediante resonancia de plasmón superficial obtenidos para la unión de R11, R12 e Y31 de IgG1 a Fc-hROR1 inmovilizado. Los aumentos en

unidad de respuesta (eje y) que superaron los valores hallados para R11, R12 e Y31 de IgG1 solos indicaron epítomos independientes que permiten una unión simultánea. El eje x representa el tiempo en segundos (s).

5 La figura 5A es una serie de gráficos que representan los resultados del análisis de unión mediante resonancia de plasmón superficial obtenidos para la unión de R11, R12 e Y31 de IgG1 y Fab a Fc-hROR1 inmovilizado después de una reducción de fondo instantánea. Se sometieron a prueba los AcM a cinco o seis concentraciones diferentes que oscilaron entre 1,5 y 100 nM. Se sometió a prueba cada concentración por duplicado.

10 La figura 5B es una serie de gráficos que representan los resultados del análisis de unión mediante resonancia de plasmón superficial obtenidos para la unión de R11 e Y31 de IgG1 y Fab a Fc-mROR1 inmovilizado después de una reducción de fondo instantánea. Se sometieron a prueba los AcM a cinco o seis concentraciones diferentes que oscilaron entre 1,5 y 100 nM. Se sometió a prueba cada concentración por duplicado.

15 La figura 6A es un gráfico que representa el análisis mediante citometría de flujo de la unión de R11 (5 µg/ml), R12 (1 µg/ml) e Y31 (5 µg/ml) de IgG1 a la superficie de células JeKo-1. El sombreado en color gris indica el fondo observado con el AcM humano anti-toxoide tetánico TT11 en formato de IgG1 (TT11) (5 µg/ml). Se detectó IgG1 biotinilada con PE-estreptavidina. El eje y representa el número de eventos, y el eje x representa la intensidad de fluorescencia.

La figura 6B es un gráfico que representa el análisis mediante citometría de flujo de la unión de R11 (5 µg/ml), R12 (1 µg/ml) e Y31 (5 µg/ml) de IgG1 a la superficie de células HBL-2. El sombreado en color gris indica el fondo observado con TT11 de IgG1 (5 µg/ml). Se detectó IgG1 biotinilada con PE-estreptavidina. El eje y representa el número de eventos, y el eje x representa la intensidad de fluorescencia.

20 La figura 6C es una serie de gráficos que representan los resultados del análisis mediante citometría de flujo de la unión de R11 (5 µg/ml), R12 (1 µg/ml) e Y31 (5 µg/ml) de IgG1 a la superficie de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) para células CD19+CD5+ y células CD19-CD5+. El sombreado en color gris indica el fondo observado con P14 de IgG de conejo/ser humano quimérico como control negativo (5 µg/ml). Se detectó IgG1 biotinilada en combinación con FITC-CD19/APC-CD5 con ficoeritrina-estreptavidina (PE-estreptavidina). El eje y representa el número de eventos, y el eje x representa la intensidad de fluorescencia.

30 La figura 7A es una serie de gráficos que representan los resultados del análisis mediante citometría de flujo de la unión de R12 (5 µg/ml), R12 (1 µg/ml) e Y31 (5 µg/ml) de IgG1 a la superficie de PBMC de un paciente con LLC designado como LLC-2 para identificar subpoblaciones en PBMC de linfocitos citolíticos naturales (CD16+CD3-), células T (CD16-CD3+, CD19-CD5+) y células de LLC (CD19+CD5+). Los ejes x e y en las filas superior y central representan la intensidad de fluorescencia. En la fila inferior, el sombreado en color gris indica el fondo observado con PE-estreptavidina como control negativo sola. El eje y representa el número de eventos, y el eje x representa la intensidad de fluorescencia.

35 La figura 7B es una serie de gráficos que representan los resultados del análisis mediante citometría de flujo de la unión de R12 (5 µg/ml), R12 (1 µg/ml) e Y31 (5 µg/ml) de IgG1 a la superficie de PBMC de un paciente con LLC designado como LLC-3 para identificar subpoblaciones en PBMC de linfocitos citolíticos naturales (CD16+CD3-), células T (CD16-CD3+, CD19-CD5+) y células de LLC (CD19+CD5+). Los ejes x e y en las filas superior y central representan la intensidad de fluorescencia. En la fila inferior, el sombreado en color gris indica el fondo observado con PE-estreptavidina como control negativo sola. El eje y representa el número de eventos, y el eje x representa la intensidad de fluorescencia.

45 La figura 7C es una serie de gráficos que representan los resultados del análisis mediante citometría de flujo de la unión de R12 (5 µg/ml), R12 (1 µg/ml) e Y31 (5 µg/ml) de IgG1 a la superficie de PBMC de un paciente con LLC designado como LLC-4 para identificar subpoblaciones en PBMC de linfocitos citolíticos naturales (CD16+CD3-), células T (CD16-CD3+, CD19-CD5+) y células de LLC (CD19+CD5+). Los ejes x e y en las filas superior y central representan la intensidad de fluorescencia. En la fila inferior, el sombreado en color gris indica el fondo observado con PE-estreptavidina como control negativo sola. El eje y representa el número de eventos, y el eje x representa la intensidad de fluorescencia.

50 La figura 7D es una serie de gráficos que representan los resultados del análisis mediante citometría de flujo de la unión de R12 (5 µg/ml), R12 (1 µg/ml) e Y31 (5 µg/ml) de IgG1 a la superficie de PBMC de un paciente con LLC designado como LLC-5 para identificar subpoblaciones en PBMC de linfocitos citolíticos naturales (CD16+CD3-), células T (CD16-CD3+, CD19-CD5+) y células de LLC (CD19+CD5+). Los ejes x e y en las filas superior y central representan la intensidad de fluorescencia. En la fila inferior, el sombreado en color gris indica el fondo observado con PE-estreptavidina como control negativo sola. El eje y representa el número de eventos, y el eje x representa la intensidad de fluorescencia.

55 La figura 8A es un gráfico que representa los resultados de citometría de flujo de R11, R12 e Y31 de IgG1 en comparación con P14 de IgG1 (control negativo), IgG humana policlonal inespecífica (hIgG; control negativo) y rituximab (RTX; control positivo) hacia células JeKo-1 en presencia de complemento de conejo. Se observó tinción

con PI que indica citotoxicidad sólo para rituximab.

La figura 8B es un gráfico que representa los resultados de citometría de flujo de R11, R12 e Y31 de IgG1 en comparación con P14 de IgG1 (control negativo), IgG humana policlonal inespecífica (hIgG; control negativo) y rituximab (RTX; control positivo) hacia células HBL-2 en presencia de complemento de conejo. Se observó tinción con PI que indica citotoxicidad sólo para rituximab.

La figura 8C es un gráfico que representa los resultados de citometría de flujo de R11, R12 e Y31 de IgG1 en comparación con P14 de IgG1 (control negativo), IgG humana policlonal inespecífica (hIgG; control negativo) y rituximab (RTX; control positivo) hacia PBMC de pacientes con LLC no tratados en presencia de complemento de conejo. Se observó tinción con PI que indica citotoxicidad sólo para rituximab.

La figura 9A es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de detección de proteasa intracelular bioluminiscente que cuantifica la potencia de ADCC de R11, R12 e Y31 de IgG1 en comparación con el AcM humano anti-toxoide tetánico TT11 en formato de IgG1 (control negativo) y rituximab (RTX; control positivo) hacia células JeKo-1 y células HBL-2 a una concentración de 5 µg/ml. Las columnas indican valores medios, y las barras de error indican valores de desviación estándar de triplicados.

La figura 9B es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad frente a PBMC de tres pacientes con LLC, indicándose los valores medios mediante barras horizontales.

La figura 9C es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de detección de proteasa intracelular bioluminiscente que cuantifica la potencia de citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC) de R11, R12 e Y31 de IgG1 en comparación con el AcM humano anti-toxoide tetánico TT11 en formato de IgG1 (control negativo) y rituximab (RTX) hacia células HBL-2 a concentraciones de 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml y 0,02 µg/ml, presentándose cada concentración de izquierda (barras de color negro) a derecha (barras de color blanco), respectivamente. Las columnas indican valores medios, y las barras de error indican valores de desviación estándar de triplicados.

La figura 10A es una serie de gráficos que representan los resultados del análisis mediante citometría de flujo de densidades en superficie celular de ROR1 humano en células de LLC primarias usando R12 de IgG1 biotinilada seguido por PE-estreptavidina. El sombreado en color gris indica el fondo observado con PE-estreptavidina como control negativo sola. El eje y representa el número de eventos, el eje x representa la intensidad de fluorescencia. Se indican los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF).

La figura 10B es una serie de gráficos que representan la reducción de IMF de células de LLC primarias a lo largo del tiempo que refleja la internalización de R11, R12 e Y31 de IgG1 en las células en ausencia o presencia del inhibidor de la endocitosis óxido de fenilarsina (PAO).

La figura 11A es un gráfico que representa la apoptosis en PBMC de tres pacientes con LLC no tratados (LLC-2 (barra de color negro), LLC-3 (barra de color gris de trazo discontinuo) y LLC-4 (barra de color blanco)) en cultivo en ausencia de suero bovino fetal (FBS) e incubadas con R11, R12, Y31 o TT11 de IgG1, en comparación con rituximab como control positivo (RTX) y el control negativo, y además en presencia (+) y ausencia (-) de anticuerpo de cabra anti-IgG humana-F(ab')₂ (agente de reticulación).

La figura 11B es un gráfico que representa la apoptosis en PBMC de tres pacientes con LLC no tratados (LLC-2 (barra de color negro), LLC-3 (barra de color gris de trazo discontinuo) y LLC-4 (barra de color blanco)) en cultivo en presencia de FBS e incubadas con R11, R12, Y31 o TT11 de IgG1, en comparación con rituximab como control positivo (RTX) y control negativo, y además en presencia (+) y ausencia (-) de anticuerpo de cabra anti-IgG humana-F(ab')₂ (agente de reticulación), así como en presencia (+) y ausencia (-) de IL-4 y CD40L.

Descripción detallada de la invención

El receptor huérfano 1 similar a tirosina cinasa receptora (ROR1) es una proteína embrionaria conservada cuya expresión va reduciéndose progresivamente durante el desarrollo embrionario en mamíferos. La proteína intacta, incluyendo su dominio extracelular, no parece expresarse significativamente en tejidos normales de mamífero adulto. En particular, los estudios no han identificado una expresión significativa de ROR1 en la superficie celular de tejidos normales de ser humano adulto, incluyendo células B normales. El documento WO 2010/124188 describe anticuerpos anti-ser humano con especificidad por el receptor huérfano 1 similar a tirosina cinasa receptora (ROR1). Baskar *et al.*, Clin. Cancer Res., 14: 396-404 (2008), DaneshManesh *et al.*, Int. J. Cancer, 123: 1190-1195 (2008) y Fukuda *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 105: 3047-3052 (2008). Sin embargo, ROR1 se expresa en la superficie celular de células B malignas, incluyendo leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) y linfoma de células del manto (LCM). También se ha notificado que ROR1 se expresa en otras determinadas líneas celulares de cáncer incluyendo linfoma de Burkitt, carcinoma de células renales, cáncer de colon y cáncer de mama. Véase el documento WO 2007/0207510. Por tanto, ROR1 puede considerarse un marcador selectivo para estos cánceres. La invención proporciona un anticuerpo contra este marcador selectivo.

La invención proporciona un anticuerpo que tiene especificidad por ROR1, que comprende (a) una cadena ligera que

tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5; (b) un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6; o (c) tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b). En una realización preferida, el anticuerpo comprende tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b).

- 5 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que tiene especificidad por ROR1, que comprende (a) una cadena ligera que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 1; (b) un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 2; o (c) tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b). En una realización preferida, el anticuerpo comprende tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b).
- 10 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que tiene especificidad por ROR1, que comprende (a) una cadena ligera que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 3; (b) un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 4; o (c) tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b). En una realización preferida, el anticuerpo comprende tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b).
- 15 En una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo que tiene especificidad por ROR1, que comprende (a) una cadena ligera que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 5; (b) un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 6; o (c) tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b). En una realización preferida, el anticuerpo comprende tanto una cadena ligera de (a) como una cadena pesada de (b).
- 20 El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado que tiene especificidad por ROR1 humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5. En otras realizaciones, la identidad en porcentaje puede ser de al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% o incluso el 100%. En realizaciones preferidas, la cadena ligera tiene una identidad de al menos el 95% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5. En realizaciones más preferidas, la cadena ligera tiene una identidad del 100% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado que tiene especificidad por ROR1 humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. En otras realizaciones, la identidad en porcentaje puede ser al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% o incluso el 100%. En realizaciones preferidas, la cadena pesada tiene una identidad de al menos el 95% con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. En realizaciones más preferidas, la cadena pesada tiene una identidad del 100% con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede comprender cualquier cadena pesada tal como se describió anteriormente, en combinación con cualquier cadena ligera adecuada, tal como las descritas anteriormente. Asimismo, el anticuerpo puede comprender cualquiera de las cadenas ligeras tal como se describió anteriormente en combinación con cualquier cadena pesada adecuada, tal como las descritas anteriormente. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 2, o una cadena ligera que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 3 y una cadena pesada que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 4, o una cadena ligera que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID NO: 6. En una realización preferida, el anticuerpo comprende la cadena ligera de SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 2, la cadena ligera de SEQ ID NO: 3 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, o la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

Puede calcularse la identidad en tanto por ciento (%) de secuencias peptídicas, por ejemplo, como $100 \times [(posiciones\ idénticas)/\min(TG_A, TG_B)]$, donde TG_A y TG_B son la suma del número de residuos y posiciones de huecos internos en las secuencias peptídicas A y B en la alineación que minimiza TG_A y TG_B . Véase, por ejemplo, Russell *et al*, J. Mol Biol, 244: 332-350 (1994).

50 El anticuerpo de la invención puede ser cualquier anticuerpo incluyendo un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo que tiene especificidad por el dominio extracelular de ROR1 humano. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser policlonal, monoclonal, recombinante, quimérico o humanizado. Además, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo incluyendo sin limitación IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. Por tanto, por ejemplo, el anticuerpo puede ser cualquier IgA tal como IgA1 o IgA2, o cualquier IgG tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgG sintética. El anticuerpo también puede ser cualquier fragmento de anticuerpo que tenga especificidad por el dominio extracelular de ROR1 humano, tal como F(ab)2, Fv, scFv, IgGΔCH2, F(ab')2, scFv2CH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)2, un diacuerpo y un anticuerpo bivalente. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo modificado o sintético, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos de IgG sin reducción, cuerpo T, u otras variantes de Fc o Fab de anticuerpos.

Además de una cadena pesada tal como se describió anteriormente, el anticuerpo de la invención puede comprender además una cadena ligera seleccionada de una biblioteca de Fab usando intercambio de cadena sin procesar secuencial. Asimismo, además de una cadena ligera tal como se describió anteriormente, el anticuerpo de la invención puede comprender además una cadena pesada seleccionada de una biblioteca de Fab usando intercambio de cadena sin procesar secuencial.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo aislado, que tiene especificidad por ROR1 humano, que comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31-48. La invención también proporciona un anticuerpo aislado con especificidad por ROR1 que comprende al menos una o más variantes de las secuencias de CDR anteriores, que incluyen 1, 2 ó 3 sustituciones, inserciones, deleciones, o combinaciones de las mismas en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31-48. Por ejemplo, un anticuerpo recombinante quimérico o humanizado (o fragmento del mismo) puede incluir una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las secuencias de CDR anteriores. En realizaciones preferidas, sin embargo, el anticuerpo recombinante quimérico o humanizado (o fragmento del mismo) incluye tres secuencias de CDR de la misma cadena ligera o pesada, por ejemplo, SEQ ID NO: 31-33, SEQ ID NO: 34-36; SEQ ID NO: 37-39; SEQ ID NO: 40-42; SEQ ID NO: 43-45; o SEQ ID NO: 46-48. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo recombinante quimérico o humanizado (o fragmento del mismo) incluye seis secuencias de CDR del mismo anticuerpo, por ejemplo, (a) SEQ ID NO: 31-33 y SEQ ID NO: 40-42; (b) SEQ ID NO: 34-36 y SEQ ID NO: 43-45; o (c) SEQ ID NO: 37-39 y SEQ ID NO: 46-48.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo con avidez por ROR1 de aproximadamente 10 μM o menos, 5 μM o menos, 2 μM o menos, 1 μM o menos, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, o 200 nM o menos. La invención también proporciona un anticuerpo con avidez por ROR1 de aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 5 nM o menos. La invención proporciona además un anticuerpo con avidez por ROR1 de aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 800 pM o menos, aproximadamente 700 pM o menos, aproximadamente 600 pM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 400 pM o menos, aproximadamente 300 pM o menos, aproximadamente 200 pM o menos, o aproximadamente 100 pM o menos. Puede medirse la avidez usando técnicas conocidas en la técnica, tales como ELISA o resonancia de plasmón superficial.

El anticuerpo de la invención puede producirse mediante cualquier técnica adecuada, por ejemplo, usando cualquier sistema de expresión eucariota o no eucariota adecuado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se produce usando un sistema de expresión de mamífero.

El anticuerpo de la invención puede producirse usando un sistema de expresión no eucariota adecuado tal como un sistema de expresión bacteriano. Pueden usarse sistemas de expresión bacterianos para producir fragmentos tales como F(ab)₂, Fv, scFv, IgG Δ CH₂, F(ab')₂, scFv2CH₃, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂ y diacuerpos. Se conocen técnicas para alterar secuencias codificantes de ADN para producir tales fragmentos, en la técnica.

El anticuerpo de la invención puede conjugarse con una molécula sintética usando cualquier tipo de conjugación adecuada. Pueden usarse modificación por ingeniería recombinante y selenocisteína incorporada (por ejemplo, tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional WO/2008/122039) para conjugar una molécula sintética. Otros métodos de conjugación pueden incluir acoplamiento covalente a aminas de cadena lateral de lisina o toiles de cadena lateral de cisteína nativos o modificados por ingeniería. Véase, por ejemplo, Wu *et al.*, Nat. Biotechnol, 23: 1137-1146 (2005). La molécula sintética puede ser cualquier molécula tal como una que selecciona como diana un tumor. Por supuesto, se entenderá que la molécula sintética también puede ser una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) o un aptámero de ARN o ADN.

Las moléculas sintéticas incluyen agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos, citostáticos o antiangiogénicos, radioisótopos y liposomas. Un agente citotóxico puede ser una molécula vegetal, fúngica o bacteriana (por ejemplo, una toxina proteica). Un agente terapéutico puede ser un maitansinoide (por ejemplo, maitansinol o maitansinoide DM1), un taxano, una calicheamicina, una cemadotina o una monometilauristatina (por ejemplo, monometilauristatina E o monometilauristatina F). Los agentes terapéuticos incluyen vincristina y prednisona. Un agente terapéutico puede ser un antimetabolito (por ejemplo, un antifolato tal como metotrexato, una fluoropirimidina tal como 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina o un análogo de purina o adenosina); un agente intercalante (por ejemplo, una antraciclina tal como doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina C, dactinomicina o mitramicina); un derivado de platino (por ejemplo, cisplatino o carboplatino); un agente alquilante (por ejemplo, mostaza de nitrógeno, melfalán, clorambucilo, busulfano, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas o tiotepa); un agente antimetabólico (por ejemplo, un alcaloide de la vinca tal como vincristina, o un taxoide tal como paclitaxel o docetaxel); un inhibidor de topoisomerasa (por ejemplo, etopósido, tenipósido, amsacrina, topotecán); un inhibidor del ciclo celular (por ejemplo, un flavopiridol); o un agente de microtúbulos (por ejemplo, una epotilona, análogo de discodermolida o análogo de eleuterobina). Un agente terapéutico puede ser un inhibidor de proteosoma o un inhibidor de topoisomerasa tal como bortezomib, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido o doxorubicina. Los radioisótopos terapéuticos incluyen yodo (¹³¹I), itrio (⁹⁰Y), lutecio (¹⁷⁷Lu), actinio (²²⁵Ac), praseodimio, astato (²¹¹At), renio (¹⁸⁶Re), bismuto (²¹²Bi o ²¹³Bi) y rodio (¹⁸⁸Rh). Los agentes antiangiogénicos

incluyen linomida, bevacuzimab, angiostatina y razoxano. La molécula sintética puede ser otro anticuerpo tal como rituximab o bevacuzimab.

Una molécula sintética también puede ser un marcador. Los marcadores pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico y pueden incluir, por ejemplo, agentes de contraste. Un agente de contraste puede ser un marcador de radioisótopo tal como yodo (^{131}I o ^{125}I), indio (^{111}In), tecnecio (^{99}Tc), fósforo (^{32}P), carbono (^{14}C), tritio (^3H), otro radioisótopo (por ejemplo, un ion radiactivo), o un radioisótopo terapéutico tal como uno de los radioisótopos terapéuticos enumerados antes. Adicionalmente, los agentes de contraste pueden incluir materiales radiopacos, agentes de obtención de imágenes mediante resonancia magnética (IRM), agentes de obtención de imágenes mediante ultrasonidos, y cualquier otro agente de contraste adecuado para la detección mediante un dispositivo que obtiene imágenes del cuerpo de un animal. Una molécula sintética también puede ser un marcador fluorescente, un marcador enzimático biológicamente activo, un marcador luminiscente o un marcador cromóforo.

En aún otras realizaciones, la molécula sintética puede ser un liposoma, tal como se describe en Bendas, *BioDrugs*, 15(4): 215-224 (2001). En tales realizaciones, el anticuerpo puede conjugarse con una partícula coloidal, por ejemplo, un liposoma, y usarse para la administración controlada de un agente a células enfermas. En la preparación de un anticuerpo conjugado con un liposoma, por ejemplo, un inmunoliposoma, puede atraparse un agente tal como un fármaco quimioterápico u otro en el liposoma para la administración a una célula diana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo también puede tener especificidad por uno o más antígenos además de ROR1. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención puede modificarse por ingeniería (por ejemplo, como diacuerpo bivalente o un dímero o trímero de Fab conjugado) para tener especificidad por ROR1 y otro antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno asociado con LLC-B, LCM, linfoma de Burkitt, carcinoma de células renales, cáncer de colon (por ejemplo, adenocarcinoma de colon) o cáncer de mama (por ejemplo, adenocarcinoma de mama). El anticuerpo puede modificarse por ingeniería para tener especificidad por ROR1 y un antígeno que fomenta la activación o selección como diana de células efectoras citotóxicas.

La invención proporciona además células eucariotas o no eucariotas que se han modificado por ingeniería de manera recombinante para producir un anticuerpo de la invención. Las células eucariotas o no eucariotas pueden usarse como sistema de expresión para producir el anticuerpo de la invención. En otra realización, la invención proporciona células inmunitarias dirigidas a ROR1 que se modifican por ingeniería para expresar de manera recombinante un anticuerpo específico contra ROR1 de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona una célula T modificada por ingeniería para expresar un anticuerpo de la invención (por ejemplo, un scFv, scFv-Fc o (scFv)₂), que se une a una molécula sintética con los siguientes dominios: una región espaciadora o bisagra (por ejemplo, una secuencia de CD28 o secuencia de región bisagra de IgG4-Fc), una región transmembrana (por ejemplo, un dominio canónico transmembrana) y un dominio de señalización de receptor de células T (TCR) intracelular, formando de ese modo un cuerpo T (o receptor de antígeno quimérico (CAR)). Los dominios de señalización de TCR intracelulares que pueden incluirse en un cuerpo T (o CAR) incluyen, pero no se limitan a, dominios de señalización de CD3 ζ , FcR- γ y Syk-PT así como los dominios de coseñalización de CD28, 4-1BB y CD134. Se conocen en la técnica métodos para construir células T que expresan un cuerpo T (o CAR). Véase, por ejemplo, Marcu-Malina *et al.*, *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 9, n.º 5 (publicado en Internet el 16 de abril de 2009).

En el presente documento, se da a conocer un método de inhibición de células que expresan ROR1 poniendo en contacto las células con un anticuerpo de la invención. El anticuerpo puede ser un anticuerpo desnudo (no conjugado) o un anticuerpo conjugado con una molécula sintética, por ejemplo, un agente citotóxico, citostático o antiangiogénico, un radioisótopo o incluso con un liposoma. El método puede usarse para inhibir células que expresan ROR1 *in vitro* o en un sujeto (es decir, *in vivo*). Las células que expresan ROR1 puestas en contacto pueden estar, por ejemplo, en un cultivo celular o modelo animal de un trastorno asociado con niveles elevados de ROR1. El método es útil, por ejemplo, para medir y/o clasificar (con relación a otro anticuerpo) la actividad inhibitoria del anticuerpo para un tipo de célula de ROR específico. La inhibición de las células que expresan ROR1 puede incluir bloquear o reducir la actividad o el crecimiento de células que expresan ROR1. La inhibición también puede incluir la destrucción de células que expresan ROR1. Aunque el método no está restringido por ni limitado a ningún mecanismo de acción particular, la actividad inhibitoria puede estar mediada por el bloqueo de la señalización mediada por ROR1 o por el bloqueo de la señalización de un receptor asociado a ROR1. La actividad inhibitoria también puede estar mediada por el reclutamiento de efectores del sistema inmunitario que atacan a células que expresan ROR1, por ejemplo, activando constituyentes de los sistemas del complemento o de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo aislado de la invención para el tratamiento de un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener un trastorno asociado con niveles elevados de ROR1. Generalmente, el método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo aislado de la invención al sujeto. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo anti-ROR1 de la invención tal como se describe en el presente documento. Por tanto, el anticuerpo puede ser quimérico, humanizado, sintético, F(ab)₂, Fv, scFv, IgG Δ CH₂, F(ab')₂, scFv2CH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv o (scFv)₂. En algunas realizaciones, el método incluye administrar una IgG, un scFv, un dsFv, un F(ab')₂, un diacuerpo o un anticuerpo bivalentes. El anticuerpo administrado puede conjugarse con una molécula sintética descrita anteriormente, por ejemplo, un

agente citotóxico, citostático o antiangiogénico, un radioisótopo terapéutico o un liposoma. Un agente citotóxico a modo de ejemplo es la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38). Los trastornos que pueden tratarse incluyen, por ejemplo, LLC-B y LCM. Otros trastornos asociados con ROR1 elevado que pueden tratarse incluyen linfoma de Burkitt, carcinoma de células renales, cáncer de colon (por ejemplo, adenocarcinoma de colon) y cáncer de mama (por ejemplo, adenocarcinoma de mama).

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo aislado de la invención para el tratamiento de un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener un trastorno asociado con niveles elevados de ROR1 mediante transferencia adoptiva de las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento, que expresan un anticuerpo de la invención como cuerpo T (o CAR) que se une selectivamente a ROR1. Puede usarse tecnología recombinante para introducir material genético que codifica para cuerpos T (o CAR) en cualquier célula T adecuada, por ejemplo, células T de memoria central del sujeto que va a tratarse. Las células T que portan el material genético pueden expandirse (por ejemplo, en presencia de citocinas). Las células T modificadas por ingeniería genética se transfieren, normalmente mediante infusión, al paciente. Las células T transferidas de la invención pueden producir entonces una respuesta inmunitaria frente a células que expresan ROR1 en el sujeto. El método de transferencia adoptiva puede usarse, por ejemplo, para tratar sujetos que tienen o se sospecha que tienen LLC-B, LCM, linfoma de Burkitt, carcinoma de células renales, cáncer de colon (por ejemplo, adenocarcinoma de colon) o cáncer de mama (por ejemplo, adenocarcinoma de mama).

En algunas realizaciones, los usos anteriores pueden incluir además coadministrar un segundo agente terapéutico para el trastorno asociado con ROR1 elevado. Por ejemplo, cuando el trastorno que va a tratarse implica un cáncer que expresa ROR1, el método puede incluir además la coadministración de un agente citotóxico, citostático o antiangiogénico adecuado para tratar el cáncer. Si el cáncer es un tumor maligno de células B, los usos pueden incluir además, por ejemplo, la coadministración de rituximab, alemtuzumab, ofatumumab, o un régimen de quimioterapia CHOP.

Los términos “tratar”, “tratando”, “tratamiento” y “terapéuticamente eficaz” usados en el presente documento no implican necesariamente un tratamiento completo o al 100%. Más bien, existen grados variables de tratamiento que reconoce un experto habitual en la técnica que tienen un posible beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, el método inventivo puede proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento. Además, el tratamiento proporcionado por el método inventivo puede incluir el tratamiento de uno o más estados o síntomas de la enfermedad que esté tratándose.

En otra realización, la invención proporciona un método de detección *in vitro* en una muestra de prueba de un nivel alterado de ROR1 (por ejemplo, la ROR1 de superficie celular), por ejemplo, con relación a un control. Generalmente, el método incluye poner en contacto una muestra de prueba con un anticuerpo de la invención y determinar la cantidad de anticuerpo que se une selectivamente al material (por ejemplo, células) en la muestra para determinar de ese modo el nivel de ROR1 en la muestra de prueba. Una muestra de prueba puede proceder de un cultivo celular o de un sujeto de prueba, por ejemplo, una muestra de plasma o de tejido de un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener una enfermedad o un estado asociado con ROR1 elevado en un sujeto. Un nivel de control corresponde de manera deseable al nivel de ROR1 detectado usando el mismo anticuerpo en una(s) muestra(s) correspondiente(s) de uno o más cultivos o sujetos control. Los métodos de uso del anticuerpo de la invención para determinar niveles de ROR1 pueden incluir cualquier inmunoensayo tal como inmunotransferencia (de tipo Western), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y citometría de flujo, por ejemplo, análisis mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

El método de detección puede usarse para examinar la presencia de un trastorno asociado con ROR1 elevado. El método incluye obtener una muestra de un sujeto de prueba que necesita examinarse, por ejemplo, un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener un trastorno asociado con ROR1 elevado. El nivel de ROR1 (por ejemplo, la cantidad o concentración) en la muestra se mide usando un anticuerpo de la invención, y el nivel en la muestra se compara con un nivel de control de ROR1. El nivel de control representa, por ejemplo, el nivel medio (por ejemplo, la cantidad o concentración) en muestra(s) de uno o, preferiblemente, múltiples sujetos de grupo control que no tienen un trastorno asociado con ROR1 elevado. Alternativamente, el nivel de control puede corresponder al nivel o nivel medio de ROR1 en una o más muestras tomadas del sujeto de prueba en uno o más momentos previos, tales como cuando el sujeto de prueba no tenía o no mostraba un estado asociado con ROR1 elevado. Un nivel de ROR1 significativamente mayor en la muestra de prueba con relación al nivel de control es indicativo de un trastorno asociado con ROR1 elevado en el sujeto.

En sujetos tales como seres humanos, en los que la expresión de ROR1 en la superficie celular se restringe en gran medida al desarrollo embrionario, el nivel de control de ROR1 puede ser cero o nulo. Por tanto, en algunas realizaciones del método de detección proporcionado por la invención, cualquier cantidad de ROR1 significativa y detectable en una muestra de prueba puede ser indicativa de un trastorno asociado con ROR1 elevado en el sujeto.

Adicionalmente, puede usarse el método de detección para monitorizar la evolución de un trastorno asociado con ROR1 elevado. El método incluye obtener una muestra de un sujeto que necesita examinarse, por ejemplo, un sujeto que al que se le ha diagnosticado o que se sospecha que tiene un trastorno asociado con ROR1 elevado. El nivel de ROR1 en la muestra se mide usando un anticuerpo de la invención, y el nivel en la muestra se compara con

un nivel de control correspondiente al nivel o nivel medio de ROR1 en una o más muestras tomadas del sujeto de prueba en uno o más momentos previos. Los niveles de ROR1 que están significativamente elevados o disminuidos con relación al control indican que el trastorno del sujeto está deteriorándose o mejorando, respectivamente.

5 El método de detección *in vitro* anterior puede usarse para examinar la presencia o monitorizar la evolución de trastornos incluyendo, por ejemplo, LLC-B, LCM, linfoma de Burkitt, carcinoma de células renales, cáncer de colon (por ejemplo, adenocarcinoma de colon) y cáncer de mama (por ejemplo, adenocarcinoma de mama).

10 En el presente documento, se da a conocer además un método para examinar a un sujeto para detectar un nivel alterado de ROR1. Generalmente, el método incluye administrar al sujeto un anticuerpo de la invención que se conjuga con un marcador (por ejemplo, un agente de contraste), obtener imágenes del sujeto de manera adecuada para detectar el marcador, y determinar si una región en el sujeto tiene una densidad o concentración alterada de marcador en comparación con el nivel de fondo de marcador en tejido proximal. Alternativamente, el método incluye determinar si existe una densidad o concentración alterada de marcador en una región en comparación con la densidad o concentración de marcador detectada previamente en la misma región del sujeto. Los métodos de obtención de imágenes de un sujeto pueden incluir obtención de imágenes mediante rayos X, obtención de imágenes mediante tomografía computerizada (TC) de rayos X (por ejemplo, obtención de imágenes mediante angiografía con TC (ATC)), obtención de imágenes mediante resonancia magnética (RM), angiografía mediante resonancia magnética (ARM), medicina nuclear, obtención de imágenes mediante ultrasonidos (US), obtención de imágenes ópticas, elastografía, obtención de imágenes mediante infrarrojos, obtención de imágenes mediante microondas, y similares, según sea apropiado para detectar el marcador conjugado con el anticuerpo. En una realización preferida, el sujeto tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener un tumor que expresa ROR1, tal como LLC-B, LCM, linfoma de Burkitt, carcinoma de células renales, tumor de colon (por ejemplo, adenocarcinoma de colon) o tumor de mama (por ejemplo, adenocarcinoma de mama), y el método se usa para examinar o detectar la presencia del tumor. En otra realización, el método puede usarse para monitorizar el tamaño o la densidad de un tumor que expresa ROR1 a lo largo del tiempo, por ejemplo, durante un ciclo de tratamiento.

25 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo tal como se describió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas a partir de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. Las composiciones a modo de ejemplo incluyen uno o más de un anticuerpo quimérico que tiene SEQ ID NO: 1 (cadena ligera) y/o SEQ ID NO: 2 (cadena pesada), un anticuerpo quimérico que tiene SEQ ID NO: 3 (cadena ligera) y/o SEQ ID NO: 4 (cadena pesada), y un anticuerpo quimérico que tiene SEQ ID NO: 5 (cadena ligera) y/o SEQ ID NO: 6 (cadena pesada). Otra composición a modo de ejemplo comprende un anticuerpo humanizado que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31-48. En realizaciones preferidas, sin embargo, el anticuerpo incluye tres secuencias de CDR de la misma cadena ligera o pesada, por ejemplo, SEQ ID NO: 31-33, SEQ ID NO: 34-36; SEQ ID NO: 37-39; SEQ ID NO: 40-42; SEQ ID NO: 43-45; o SEQ ID NO: 46-48. En realizaciones más preferidas, la composición incluye un anticuerpo que tiene seis secuencias de CDR del mismo anticuerpo, por ejemplo, (a) SEQ ID NO: 31-33 y SEQ ID NO: 40-42; (b) SEQ ID NO: 34-36 y SEQ ID NO: 43-45; o (c) SEQ ID NO: 37-39 y SEQ ID NO: 46-48. Todavía otra composición farmacéutica a modo de ejemplo incluye un fragmento dsFv, que puede incluir una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos según sea apropiado y entienda un experto habitual en la técnica.

40 La composición de la invención comprende un portador para el anticuerpo, de manera deseable un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier portador farmacéuticamente aceptable adecuado. El término "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa uno o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes, otros excipientes, o sustancias de encapsulación que son adecuados para la administración en un paciente humano o veterinario (por ejemplo, un portador fisiológicamente aceptable o un portador farmacológicamente aceptable). El término "portador" indica un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar el uso del principio activo, por ejemplo, la administración del principio activo a un sujeto. El portador farmacéuticamente aceptable puede mezclarse con uno o más de los componentes activos, por ejemplo, una molécula híbrida, y unos con otros, cuando está presente más de un portador farmacéuticamente aceptable en la composición, de manera que no afecte sustancialmente a la eficacia farmacéutica deseada. Los materiales "farmacéuticamente aceptables" normalmente pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, un paciente, sin la producción de efectos fisiológicos no deseados significativos tales como náuseas, mareo, exantema o molestias gástricas. Se desea, por ejemplo, que una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable no sea inmunogénica cuando se administra a un paciente humano para fines terapéuticos.

55 La composición farmacéutica puede contener agentes tamponantes adecuados, incluyendo, por ejemplo, ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal. La composición farmacéutica también puede contener opcionalmente conservantes adecuados, tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal.

60 La composición farmacéutica puede presentarse en forma de dosificación unitaria y puede prepararse mediante cualquier método adecuado, muchos de los cuales se conocen bien en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de poner el anticuerpo de la invención en asociación con un portador que constituye uno o más

componentes auxiliares. En general, la composición se prepara poniendo el agente activo uniforme e íntimamente en asociación con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, dándole forma al producto.

5 Una composición adecuada para la administración parenteral comprende de manera conveniente una preparación acuosa estéril de la composición inventiva, que preferiblemente es isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa puede formularse según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, de manera convencional se emplean aceites fijos, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, tal como mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Pueden encontrarse formulaciones de portador adecuadas para la administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

10 Los sistemas de administración útiles en el contexto de la invención incluyen sistemas de administración de liberación programada, liberación retardada y liberación sostenida de tal manera que la administración de la composición inventiva se produce antes de, y con suficiente tiempo como para provocar la, sensibilización del sitio que va a tratarse. La composición inventiva puede usarse junto con otros agentes terapéuticos o terapias. Tales sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de la composición inventiva, aumentando de ese modo la conveniencia para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para determinadas composiciones de la invención.

20 Se dispone de muchos tipos de sistemas de administración por liberación y los conocen los expertos habituales en la técnica. Los sistemas de administración por liberación adecuados incluyen sistemas de base polimérica tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, poli(ácido hidroxibutírico) y polianhídridos. Se describen microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos, por ejemplo, en la patente U.S. 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas de tipo Silastic; sistemas de base peptídica; recubrimientos de ceras; comprimidos obtenidos por compresión usando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas erosivos en los que la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz tal como las descritas en las patentes U.S. 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas difusivos en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes U.S. 3.832.253 y 3.854.480. Además, pueden usarse sistemas de administración de hardware basado en bombas, algunos de los cuales están adaptados para su implantación.

30 El término "sujeto" se usa en el presente documento, por ejemplo, en relación con métodos terapéuticos y de diagnóstico, para referirse a sujetos humanos o animales. Los sujetos animales incluyen, pero no se limitan a, modelos animales, tales como, modelos de mamífero de estados o trastornos asociados con la expresión elevada de ROR1 tales como LLC-B, LCM, linfoma de Burkitt, carcinoma de células renales, cáncer de colon, (por ejemplo, adenocarcinoma de colon) y cáncer de mama (por ejemplo, adenocarcinoma de mama).

40 La invención también proporciona kits adecuados para llevar a cabo los métodos de la invención. Normalmente, un kit comprende dos o más componentes requeridos para realizar un método terapéutico o de detección de la invención. Los componentes del kit incluyen, pero no se limitan a, uno o más anticuerpos de la invención, reactivos y/o equipos adecuados.

45 Un kit puede comprender un anticuerpo de la invención y un tampón de inmunoensayo adecuado para detectar ROR1 (por ejemplo mediante ELISA, citometría de flujo, clasificación magnética o FACS). El kit también puede contener una o más placas de microtitulación, patrones, diluyentes de ensayo, tampones de lavado, tapas de placa con adhesivo, perlas magnéticas, imanes y/o instrucciones para llevar a cabo un método de la invención usando el kit. El kit puede incluir un anticuerpo de la invención unido a un sustrato (por ejemplo, una placa de múltiples pocillos o un chip), que se envasa de manera adecuada y es útil para detectar ROR1. En algunas realizaciones, el kit incluye un anticuerpo de la invención que se conjuga con un marcador, tal como, un marcador fluorescente, un marcador enzimático biológicamente activo, un marcador luminiscente o un marcador cromóforo. El kit puede incluir además reactivos para visualizar el anticuerpo conjugado, por ejemplo, un sustrato para la enzima. En algunas realizaciones, el kit incluye un anticuerpo de la invención que se conjuga con un agente de contraste y, opcionalmente, uno o más reactivos o equipos útiles para la obtención de imágenes del anticuerpo en un sujeto.

50 Generalmente el anticuerpo de la invención en un kit se envasa de manera adecuada, por ejemplo, en un vial, una bolsa, ampolla y/o cualquier recipiente apropiado para un método terapéutico o de detección. Los componentes del kit pueden proporcionarse como concentrados (incluyendo composiciones liofilizadas), que pueden diluirse adicionalmente antes de su uso, o pueden proporcionarse a la concentración de uso. Para el uso del anticuerpo de

la invención *in vivo*, pueden proporcionarse dosificaciones individuales en recipientes esterilizados que tienen la cantidad y concentración deseadas de los componentes.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no deben interpretarse como que limitan en modo alguno su alcance.

5 EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra la preparación de anticuerpos Fab monoclonales con especificidad por ROR1.

Se expresaron los tres dominios extracelulares de ROR1 humano solos (hROR1ECD) o como una proteína de fusión con el dominio Fc de IgG1 humana (Fc-hROR1) (figura 1). Se usaron Fc-hROR1 y hROR1ECD purificados para inmunizar y reforzar dos grupos de conejos del alotipo b9 para preparar bibliotecas de Fab de conejo/ser humano quiméricos tal como se describe en Popkov, J. Mol. Biol, 325(2): 325-335 (2003). Se usaron un total de seis conejos de alotipo b9. Se inmunizaron cuatro conejos y se reforzaron tres veces con 100 µg de Fc-hROR1, usando adyuvante completo e incompleto de Freund (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) para dos conejos y adyuvante TiterMax (Sigma-Aldrich) para los otros dos conejos. La biblioteca R se basó en estos cuatro conejos. La biblioteca Y se basó en dos conejos adicionales que se inmunizaron con 100 µg de Fc-hROR1 y se reforzó tres veces con 100 µg de hRORECD usando adyuvante Ribi (Sigma-Aldrich). Se extrajeron el bazo y la médula ósea de ambos fémures de cada conejo cinco días después del refuerzo final y se procesaron para la preparación de ARN total y amplificación por RT-PCR de secuencias que codifican para V_K, V_λ y V_H de conejo usando combinaciones de cebadores y protocolos establecidos tal como se describe en Rader, Methods Mol. Biol, 525: 101-128, xiv (2009). Se ensamblaron segmentos de V_L de conejo/C_K de ser humano/V_H de conejo en una etapa de fusión basándose en PCR de extensión por solapamiento de 3 fragmentos, se digirieron con *Sfi*I y se clonaron en pC3C. La transformación de la cepa de *E. coli* XLI-Blue (Stratagene; La Jolla, CA) mediante electroporación produjo aproximadamente 2,5 x 10⁹ y 1,4 x 10⁸ transformantes independientes para las bibliotecas R e Y, respectivamente.

Usando el fago auxiliar VCSM13 (Stratagene), se convirtieron las bibliotecas de fagémidos en bibliotecas de fagos y se seleccionaron mediante cribado frente a proteína inmovilizada. Se seleccionaron las bibliotecas R e Y en paralelo mediante cuatro tandas de cribado frente a hROR1ECD. Además, se seleccionó la biblioteca Y mediante tres tandas de cribado con hROR1ECD seguido por una tanda de cribado final con Fc-hROR1. Durante el cribado frente a Fc-hROR1 inmovilizado, se añadieron anticuerpos de IgG humana policlonal inespecífica (Thermo Scientific; Rockford, IL) como señuelo a una concentración final de 1 µg/µl. Se analizaron los sobrenadantes de clones seleccionados inducidos por IPTG mediante ELISA usando hROR1ECD y Fc-hROR1 inmovilizados y mediante citometría de flujo usando células HEK 293F transfectadas de manera estable con ROR1 humano (Kwong *et al.*, J. Mol. Biol., 384(5): 1143-56 (2008)). Se usó el AcM de rata anti-HA, 3F10, conjugado con peroxidasa del rábano picante (Roche) en ELISA a una concentración de 50 ng/nl. Se midió la absorbancia a 405 nm usando un lector de microplacas VersaMax (Molecular Devices; Sunnyvale, CA) y software SoftMax Pro (Molecular Devices). Se usó el AcM de rata anti-HA, 3F10, conjugado con biotina en citometría de flujo a una concentración de 5 µg/ml. Se analizó la intensidad de fluorescencia usando un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences) y software analítico FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

Se identificaron clones repetidos mediante la obtención de la huella de ADN con *Alu*I, y se determinaron las secuencias de V_L y V_H de clones únicos mediante secuenciación de ADN tal como se describe en Rader, Methods Mol Biol, 525: 101-128, xiv (2009).

40 Tal como se resume en la tabla 1, se identificaron siete clones de Fab de conejo/ser humano quiméricos diferentes que se unieron a hROR1ECD.

Tabla 1. Panel de Fab de conejo/ser humano quiméricos seleccionados mediante presentación en fago.

Clon ¹	Biblioteca	Tandas de cribado		Repeticiones	Unión		
		hROR1 ECD	Fc-hROR1		hROR1 ECD ²	Fc-hROR1 ²	HEK 293F/hROR1 ³
R11	R	4	0	26/31	++	++	+
R12	R	4	0	1/31	++	++	++
Y4	Y	4	0	2/31	++	-	-
Y13	Y	4	0	14/31	++	-	-
Y14	Y	4	0	2/31	+	-	-
Y27	Y	4	0	13/31	++	-	-
Y31	Y	3	1	4/4	+	+	+

¹Definido mediante secuencia y huella de ADN única.

²Tal como se mide mediante ELISA

45 ³Tal como se mide mediante citometría de flujo

De los siete clones proporcionados en la tabla 1, tres clones (designados como R11, R12 e Y31) también se unieron a Fc-hROR1 y ROR1 humano de superficie celular expresados por células HEK 293F transfectadas de manera

estable tal como se describe en Kwong *et al.*, J. Mol. Biol, 384(5): 1143-56 (2008). Se transfirieron los casetes de expresión que codificaban para R11, R12 e Y31 de Fab mediante clonación en *Sfil* a un casete de expresión de Fab-(His)₆ en el vector pET11a con un promotor de T7 inducible por IPTG (Stahl *et al.*, J. Mol Biol, 397(3): 697-708 (2010)) para eliminar la cola de HA y fragmento III génico que codifica para las secuencias de pC3C (Hofer *et al.*, J. Immunol Methods, 318(1-2): 75-87 (2007)), y añadir una cola de (His)₆ C-terminal. Tras la transformación en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) y la expresión a través de la inducción con IPTG, se purificaron R11, R12 e Y31 de Fab a partir de sobrenadantes bacterianos mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados usando una columna HisTrap de 1 ml (GE Healthcare) tal como se describe en Kwong, K.Y. y C. Rader, Curr. Protoc. Protein Sci., capítulo 6: unidad 6, 10 (2009), seguido por cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex 200 10/300 GL con un instrumento AKTA FPLC (GE Healthcare). Se analizaron la calidad y la cantidad de Fab purificado mediante SDS-PAGE y absorbancia a 280 nm, respectivamente, y se secuenciaron los dominios variables de R11, R12 e Y31.

Tal como se representa en la figura 2, las diversas secuencias de aminoácidos de ambas regiones de marco y de determinación de la complementariedad de los dominios variables de conejo de R11, R12 e Y31 revelaron las líneas germinales V_κ (R11, Y31), V_λ (R12) y V_H no relacionadas.

Estos resultados demuestran la producción de anticuerpos Fab contra ROR1.

EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra la preparación de anticuerpos IgG monoclonales con especificidad por ROR1.

Para la expresión de R11, R12 e Y31 en formato de IgG1, se usó el vector PIGG tal como se describe en Popkov *et al.*, J. Mol. Biol, 325(2): 325-335 (2003). En este vector, se expresan cadenas ligeras κ y pesadas γ1 mediante un casete de promotor de CMV bidireccional modificado por ingeniería. Se amplificaron por PCR las secuencias que codificaban para V_H de R11 y R12 de Fab usando los cebadores R11-VH-5' (gaggaggagctcactcccagtcggtgaaggagtcgca [SEQ ID NO: 49]) y P14-VH-5' (Hofer *et al.*, J. Immunol. Methods, 318(1-2): 75-87 (2007)), respectivamente, en combinación con R11-12-VH-3' (ccgatgggccccttggtggaggctgaggagatggtgaccagggtgcctggtccccagatg [SEQ ID NO: 50]), y se clonaron a través de *Apal/Sacl* en PIGG. Se amplificaron por PCR las secuencias que codificaban para cadena ligera de R11 y R12 de Fab usando los cebadores P14-ligera-5' (Hofer *et al.*, J. Immunol. Methods, 318(1-2): 75-87 (2007)) y R12-ligera-5' (gaggagaagctgttgcctctggtctctggtgcctacggggaactcgctgctgactcagtc [SEQ ID NO: 51]), respectivamente, en combinación con el cebador C-kappa-3' (Hofer *et al.*, J. Immunol. Methods, 318(1-2): 75-87 (2007)), y se clonaron a través de *HindIII/XbaI* en PIGG con la secuencia que codifica para cadena pesada correspondiente.

La cadena ligera de conejo/ser humano quimérica resultante de R12 se compone de un dominio V_λ de conejo y uno C_κ humano. Se amplificó por PCR la secuencia que codifica para V_H de Y31 de Fab usando los cebadores M5-VH-5' y M5-VH-3' (Hofer *et al.*, J. Immunol. Methods, 318(1-2): 75-87 (2007)), y se clonaron a través de *Apal/Sacl* ligamiento en PIGG. Para eliminar un sitio *HindIII* mediante mutación silenciosa, se amplificaron por PCR dos fragmentos de la secuencia que codifica para cadena ligera de Y31 de Fab usando los cebadores P14-ligera-5' en combinación con Y31-ligera-3' (attggatgcataatagatcagtagcttggaggctg [SEQ ID NO: 52]) e Y31-ligera-5' (aaccagggcagcctccaagctactgatct [SEQ ID NO: 53]) en combinación con C-kappa-3', se fusionaron mediante PCR de extensión por solapamiento usando los cebadores P14-ligera-5' y C-kappa-3', y se clonaron a través de *HindIII/XbaI* en PIGG con la secuencia que codifica para cadena pesada correspondiente. Se transfectaron de manera transitoria los plásmidos PIGG-R11, PIGG-R12 y PIGG-Y31 resultantes en células HEK 293F humanas (Invitrogen; Carlsbad, CA) con 293fectin (Invitrogen), y se purificaron mediante columna HiTrap de proteína A recombinante de 1 ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ) tal como se describe en Hofer *et al.*, J. Immunol. Methods, 318(1-2): 75-87 (2007). Se analizaron la calidad y la cantidad de IgG1 purificada mediante SDS-PAGE y absorbancia A₂₈₀, respectivamente. Estos resultados demuestran la producción de anticuerpos IgG contra ROR1.

EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra especificidad y el mapeo de epítomos de anticuerpos Fab y IgG de conejo/ser humano quiméricos contra ROR1.

Se prepararon R11, R12 e Y31 como Fab e IgG. Se prepararon regiones Fab tal como se describe en el ejemplo 1. Se prepararon anticuerpos IgG de conejo/ser humano quiméricos tal como se describe en el ejemplo 2. Se examinó con sonda la especificidad de Fab e IgG1 purificados, mediante ELISA con un panel extendido de proteínas ROR1 recombinantes que incluía Fc-hROR1, su análogo de ratón Fc-mROR1 y cinco proteínas de fusión de Fc con sólo uno o dos dominios extracelulares de ROR1 humano tal como se muestra en la figura 1. También se incluyó hROR2-Fc disponible comercialmente (R&D Systems; Minneapolis, MN). Se usó Fab de conejo/ser humano quimérico y P14 de IgG1 frente a NgR2 (Hofer *et al.*, J. Immunol. Methods, 318(1-2): 75-87 (2007)) como control negativo. Fab (datos no mostrados) e IgG1 (figura 3) revelaron patrones de unión idénticos. Tal como se muestra en la figura 3A, R11, R12 e Y31 de IgG1 se unieron a ROR1 humano, pero no a ROR2 humano. Además, se encontró que R11 e Y31 de IgG1 daban reacción cruzada con ROR1 de ratón. La unión de R11, R12 e Y31 de IgG1 a sólo uno o dos dominios extracelulares de ROR1 humano (figura 3B) confirmó el reconocimiento de tres epítomos

diferentes. En el reconocimiento selectiva de Fc-hROR1kr y Fc-hROR1kr+fz, R11 de IgG1 fue el único AcM que se mapeó en un dominio individual. En cambio, R12 e Y31 de IgG1 reconocieron de manera selectiva Fc-hROR1ig+fz y Fc-ROR1fz+kr, respectivamente, pero no reconocieron ninguno de los dominios individuales, indicando de ese modo que los epítomos de estos AcM o bien están ubicados en la región que une dos dominios vecinos, es decir en la unión de los dominios de Ig y Fz en el caso de R12 y en la unión de los dominios Fz y Kr en el caso de Y31, o bien se unen a epítomos conformacionales que requieren la presencia de estos dos dominios vecinos.

Se encontró que los tres epítomos de R11, R12 e Y31 de IgG1 abarcan una gran parte de la región extracelular de ROR1 humano. Para investigar las implicaciones terapéuticas de la unión distal y proximal a membrana de los AcM anti-ROR1, también se analizó la independencia de los tres epítomos mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento Biacore X100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se realizaron estudios usando resonancia de plasmón superficial para la medición de las afinidades de R11, R12 e Y31 de Fab y las afinidades virtuales de R11, R12 e Y31 de IgG1 a Fc-hROR1 y Fc-mROR1, así como para el mapeo de epítomos. Para mediciones de afinidad, se activaron chips sensores CM5 para la inmovilización con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Se inmovilizaron las proteínas de fusión Fc-hROR1 y Fc-mROR1 en acetato de sodio 10 mM (pH 5,0) a una densidad de 669 unidades de resonancia (UR) para Fc-hROR1 y 429 UR para Fc-mROR1 en dos celdas de flujo en chips sensores independientes. Posteriormente, se desactivaron los chips sensores con clorhidrato de etanolamina 1 M (pH 8,5). Cada chip sensor incluía una celda de flujo vacía para la reducción de fondo instantánea. Todos los ensayos de unión usaron tampón de ejecución 1 x HBS-EP+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM (pH 7,4) y surfactante P20 al 0,05% (v/v)) y una velocidad de flujo de 30 µl/min. Se inyectaron R11, R12 e Y31 de Fab e IgG1 a cinco o seis concentraciones diferentes que oscilaron entre 1,5 y 100 nM por duplicado. Se regeneraron los chips sensores con glicina-HCl (pH 2,0) sin ninguna pérdida de capacidad de unión. El cálculo de las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se basó en un modelo de unión de Langmuir 1:1. Se calculó la constante de disociación de equilibrio (K_d) a partir de k_{on}/k_{off} . Para estudios de mapeo de epítomos, se inmovilizó Fc-hROR1 en un chip sensor CM5 a una densidad de 219 UR. Se prepararon R11, R12 e Y31 de IgG1 como una disolución 300 nM en tampón de ejecución 1 x HBS-EP+. En el primer ciclo, se inyectó en primer lugar R11 de IgG1, seguido por una mezcla de R11 y R12 de IgG1, seguido finalmente por una mezcla de R11, R12 e Y31 de IgG1. Se incluyeron R11 de IgG1 o R11 de IgG1 en combinación con R12 de IgG1 en estas mezclas para impedir la pérdida de señal debido a disociación. En el segundo ciclo, el orden de inyección fue R11, R11+Y31 y R11+Y31+R12. De manera análoga, se inyectó en primer lugar R12 en los ciclos tercero y cuarto, y se inyectó en primer lugar Y31 en los ciclos quinto y sexto. Los aumentos en UR que superaron los valores hallados para R11, R12 e Y31 de IgG1 solos indicaron epítomos independientes que permiten la unión simultánea.

Tal como se muestra en la figura 4, se encontró que R11 y R12 de IgG1 se unen de manera simultánea e independiente a Fc-hROR1 con independencia de la secuencia de inyección. En cambio, se encontró que R11 de IgG1, pero no R12 de IgG1, bloqueaba la unión de Y31 de IgG1 cuando se inyectaba en primer lugar o competía con la unión de Y31 de IgG1 cuando se inyectaba en segundo lugar. La resonancia de plasmón superficial también reveló la unión simultánea de R11 y R12 de Fab a Fc-hROR1 (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran que los epítomos de R11 en el dominio Kr e Y31 en la unión de los dominios Fz y Kr se solapan parcialmente, mientras que R12 se une a un epítomo independiente en la unión de los dominios de Ig y Fz.

EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra diversas propiedades de unión de los AcM R11, R12 e Y31 en formato de IgG y Fab.

Se usó resonancia de plasmón superficial con el Biacore instrumento X100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), tal como se describe en el ejemplo 3, para medir la afinidad y avidéz de los AcM R11, R12 e Y31 en formato de Fab y IgG1, respectivamente, tal como se muestra en la tabla 2 y la figura 5. Se encontró que R12 de Fab era el agente de unión más fuerte con una afinidad de 0,56 nM a Fc-hROR1. R11 e Y31 de Fab revelaron afinidades de 2,7 y 8,8 nM, respectivamente. Se determinó una velocidad de disociación aproximadamente veinte veces más lenta para R12 de Fab, mientras que se encontró que R11 de Fab tenía una velocidad de asociación más rápida. La conversión de Fab monovalente a IgG1 bivalente aumentó la afinidad virtual de R11, R12 e Y31 en un factor de 14, 5 y 12, respectivamente; las tres IgG1 revelaron una avidéz subnanomolar. Confirmando los datos de ELISA, R11 e Y31 revelaron afinidades y avidéces comparables por Fc-hROR1 y Fc-mROR1, indicando que sus epítomos se conservan completamente entre ROR1 humano y de ratón. En cambio, R12 no reveló una unión detectable a Fc-mROR1.

Tabla 2

AcM	Antígeno	k_{on} (10^5) ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (10^{-4}) (s^{-1})	K_d (nM)
R11 de Fab	Fc-hROR1	20,4	54,7	2,7
	Fc-mROR1	16,9	50,4	3,0
11 de IgG1	Fc-hROR1	19,4	3,6	"0,19"
	Fc-mROR1	9,9	3,0	"0,30"
R12 de Fab	Fc-hROR1	5,5	3,1	0,56
	Fc-mROR1	sin unión	sin unión	sin unión
R12 de IgG1	Fc-hROR1	5,5	0,62	"0,11"

	Fc-mROR1	sin unión	sin unión	sin unión
Y31 de Fab	Fc-hROR1	8,5	75,2	8,8
	Fc-mROR1	9,1	38,3	4,2
Y31 de IgG1	Fc-hROR1	4,9	3,5	"0,71"
	Fc-mROR1	5,4	2,4	"0,44"

Tal como se describe en el ejemplo 1, R11, R12 e Y31 de Fab reconocieron ROR1 humano de superficie celular expresado por células HEK 293F transfectadas de manera estable. Se usó citometría de flujo para validar la unión selectiva de R11, R12 e Y31 de IgG1 a células JeKo-1 y HBL-2 (figuras 6A-B). JeKo-1 y HBL-2 son líneas celulares de linfoma de células del manto humanas que expresan ROR1 a niveles similares a los de las células de LLC humanas primarias. Se tiñeron las células usando metodología convencional de citometría de flujo. En resumen, para Fab anti-ROR1, se tiñeron las células con Fab no purificado o purificado en hielo durante 1 h. Después de lavar dos veces con tampón de citometría de flujo enfriado con hielo (PBS que contiene FBS al 1% (v/v)), se incubaron las células con 5 µg/ml de AcM de rata biotilado anti-HA, 3F10 (Roche) en tampón de citometría de flujo en hielo durante 1 h, se lavaron como antes, y se tiñeron con PE-estreptavidina (BD Biosciences) en hielo durante 30 min. Para IgG1 anti-ROR1, en primer lugar se bloquearon las células con hIgG a temperatura ambiente durante 20 min, luego se incubaron en hielo durante 1 h con IgG1 biotilada anti-ROR1 sola (para células HEK 293F/hROR1, JeKo-1 y HBL-2) o en combinación con FITC-CD19/APC-CD5 (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ) (para PBMC de pacientes con LLC no tratados). Después de lavar dos veces con tampón de citometría de flujo enfriado con hielo, se tiñeron las células con PE-estreptavidina en hielo durante 30 min. Se añadió yoduro de propidio (PI) hasta una concentración final de 5 µg/ml para excluir del análisis las células muertas. Se analizaron las células usando un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences) y software analítico FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

Se usó AcM humano anti-toxoide tetánico TT11 en formato de IgG1 (Kwong *et al.*, J. Mol. Biol, 384(5): 1143-56 (2008)) como control negativo, tal como se muestra en la tabla 3, que expone los datos sobre unión mediante citometría de flujo de R11, R12 e Y31 de IgG1 a células de LLC primarias de un paciente representativo (mostrado en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF)).

Tabla 3

	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
R11 de IgG1	No determinado	6,6	18,1	64,9	137,7
R12 de IgG1	36,4	89,4	97,9	121,8	No determinado
Y31 de IgG1	No determinado	5,4	8,3	21,6	58,9
TT11 de IgG1	4,9	4,8	7,2	7,3	7,3

R12 de IgG1 demostró una unión fuerte y homogénea a concentraciones de tan sólo 0,01 µg/ml (67 pM), confirmando su avidéz subnanomolar hallada mediante resonancia de plasmón superficial. En cambio, la unión de R11 de IgG1 y, en particular, Y31 fue algo más débil y más heterogénea. Este patrón se correlaciona con las diferentes avidéces halladas para los tres AcM, y está respaldado por la accesibilidad de los tres epítopos diferentes en ROR1 de superficie celular. El presunto epítipo distal a la membrana de R12 en la unión de los dominios de Ig y Fz mejora el acceso para el formato de IgG1 voluminoso en comparación con el supuesto epítipo proximal a la membrana de R11 e Y31 en el dominio Kr y en la unión de los dominios Fz y Kr, respectivamente. De hecho, la conversión de R11 al formato scFv-Fc menos voluminoso (~100 kDa; dos cadenas de polipéptido) demostró una unión significativamente más fuerte a menores concentraciones en comparación con el formato de IgG1 (~150 kDa; cuatro cadenas de polipéptido) (datos no mostrados).

Se analizó la unión de R11, R12 e Y31 de IgG1 frente a PBMC preparadas a partir de cinco pacientes con LLC no tratados. P14 de IgG1 de conejo/ser humano quimérico frente a Ngr2 sirvió como control negativo. Se muestran representaciones gráficas de citometría de flujo representativas de un paciente con LLC en comparación con controles negativos en la figura 6B. Acorde con los resultados de Baskar *et al.*, Clin. Cancer Res., 14(2): 396-404 (2008) (AcP de cabra anti-ROR1 humano), R11, R12 e Y31 de IgG1 se unieron de manera selectiva a células de LLC (CD5+ CD19+), pero no a células B normales (CD5- CD19+), células T (CD5+ CD19-) y PBMC CD5- CD19- de pacientes con LLC no tratados. El patrón de unión a células de LLC primarias fue similar al observado para la línea celular JeKo-1, concretamente unión fuerte y homogénea de R12 de IgG1, y unión más débil y más heterogénea de R11 e Y31 de IgG1. Se muestran representaciones gráficas de citometría de flujo adicionales que muestran la unión de R12 de IgG1 a PBMC preparadas a partir de cuatro pacientes con LLC adicionales en las figuras 7A-D. La regulación para linfocitos citolíticos naturales, células T y células B normales en estos pacientes con LLC confirmó adicionalmente la especificidad de R12 de IgG1 por células de LLC.

Los resultados anteriores demuestran que R11, R12 e Y31 de IgG1 tienen avidéz subnanomolar por ROR1 y pueden usarse para distinguir específicamente (i) células tumorales obtenidas de pacientes con linfoma de (ii) células B normales tomadas de sujetos sanos.

EJEMPLO 5

Este ejemplo evalúa las propiedades citotóxicas dependientes del complemento (CDC) de anticuerpos anti-ROR1 de

conejo/ser humano quiméricos.

Como células diana, se recogieron células JeKo-1 y HBL-2 o PBMC criopreservadas de pacientes con LLC no tratados, se lavaron y se resuspendieron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10% (v/v), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, y se distribuyeron en placas de fondo en U de 96 pocillos (Corning; Corning, NY) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Después de la incubación durante 1 h en hielo con 20 µg/ml de R11, R12, Y31 de IgG1 y P14 (control negativo), así como IgG humana policlonal inespecífica (Thermo Scientific) como control negativo adicional y rituximab (Genentech; South San Francisco, CA) como control positivo, se recogieron las células, se lavaron una vez con PBS para retirar anticuerpos no unidos, y se incubaron con complemento al 20% de conejos de 3-4-semanas de edad (Pel-Freez; Rogers, AR) durante 2 h a 37°C en el 5% de CO₂. Después de añadir PI hasta una concentración final de 5 µg/ml, se detectaron las células muertas mediante la acumulación de PI usando un instrumento FACSCalibur y software analítico FlowJo.

Mientras que rituximab mediaba una potente CDC, ninguno de los otros anticuerpos reveló citotoxicidad por encima del fondo (figura 8), y tampoco lo hizo una mezcla de R11 y R12 de IgG1 o AcP IgG de conejo anti-ROR1 humano purificados del suero de estos conejos inmunizados (datos no mostrados).

Estos hallazgos no indican que ROR1 sea un antígeno adecuado para mediar en CDC mediante los AcM o AcP en formato de IgG.

EJEMPLO 6

Este ejemplo evalúa las propiedades de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de anticuerpos anti-ROR1 de conejo/ser humano quiméricos.

Se sometió a ensayo ADCC en un ensayo de liberación de proteasa bioluminiscente (ensayo de citotoxicidad Glo; Promega, Madison, WI) usando el protocolo del fabricante con modificaciones menores. Se usaron linfocitos citotóxicos naturales de voluntarios sanos preparados a partir de sangre sometida a aféresis como células efectoras. Se usaron células JeKo-1 y HBL-2 o PBMC criopreservadas de pacientes con LLC no tratados preparadas como se describe en el ejemplo 5 como células diana y se distribuyeron en placas de fondo en U de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo. Se preincubaron las células diana durante 1 h a 37°C con R11, R12, Y31, TT11 de IgG1 diluidos en serie (desde 20 hasta 0,02 µg/ml) (control negativo) y rituximab (control positivo). Sin lavar, se añadieron células efectoras (100 µl/pocillo) a una razón de células efectoras con respecto a diana de 20:1 ó 25:1 y se incubaron durante 24 h a 37°C en el 5% de CO₂. Después de centrifugación, se transfirieron 50 µl/pocillo de sobrenadante a una placa de cultivo tisular blanca Costar 3610 de 96 pocillos seguido por la adición de 25 µl/pocillo de reactivo de ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo (Promega, Madison, WI). Después de 15 min a temperatura ambiente, se midió la luminiscencia con un lector de microplacas Spectra Max M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad específica según la fórmula: citotoxicidad específica en tanto por ciento = $100 \times (EX - E_{\text{espont.}} - T_{\text{espont.}}) / (T_{\text{máx.}} - T_{\text{espont.}})$, donde EX representa la liberación desde los pocillos experimentales, $E_{\text{espont.}}$ es la liberación espontánea de células efectoras solas, $T_{\text{espont.}}$ es la liberación espontánea de células diana solas, y $T_{\text{máx.}}$ es la liberación máxima de células diana lisadas en digitonina 30 µg/ml. Se computaron los datos como la media ± la desviación estándar de triplicados.

ADCC mediada por rituximab demostró una potencia similar frente a células JeKo-1 y HBL-2 (figura 9A). Esta actividad ADCC fue robusta a lo largo de un intervalo de concentración de desde 0,02 µg/ml hasta 20 µg/ml (figura 9C). En cambio, fue detectable actividad ADCC para R12 de IgG1 sólo a o por encima de 5 µg/ml (figuras 9A, C), R11 e Y31 de IgG1 no fueron significativamente diferentes del control negativo. Se muestran resultados similares en la figura 9B, que proporciona resultados de ADCC frente a PBMC de pacientes con LLC no tratados.

Estos resultados muestran que R12 de IgG tiene una actividad ADCC débil pero no indican actividad ADCC para R11 o Y31 de IgG1.

EJEMPLO 7

Este ejemplo proporciona el análisis del papel de la internalización o disociación en la incapacidad de R11, R12 e Y31 de IgG1 para mediar en CDC y ADCC.

Usando una placa de fondo en U de 96 pocillos, en primer lugar se bloquearon 3×10^6 PBMC criopreservadas de pacientes con LLC no tratados con IgG humana policlonal inespecífica 100 µg/ml a temperatura ambiente durante 20 min, luego se tiñeron con R11 e Y31 de IgG1 biotinilada 10 µg/ml o R12 de IgG1 biotinilada 1 µg/ml en hielo durante 1 h. Después de lavar tres veces con tampón de citometría de flujo para retirar el anticuerpo no unido, o bien se dejaron las células en hielo o bien se incubaron a 37°C durante 15 min, 30 min, 1 h, y 2 h para facilitar la internalización. Además, se incubaron las células a 37°C durante 2 h en presencia de óxido de fenilarsina 10 µM (Sigma-Aldrich) para inhibir la internalización. Posteriormente, se lavaron las células una vez con tampón de citometría de flujo y se incubaron con PE-estreptavidina en hielo durante 30 min. Después de tres lavados finales con tampón de citometría de flujo, se midió la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células usando un instrumento FACSCalibur y software analítico FlowJo.

Puede explicarse la reducción de IMF mediante internalización o disociación o una combinación de ambas. Se calculó el porcentaje de reducción de IMF para cada AcM con relación al control de IgG humana policlonal inespecífica (IMF_{fondo}) y AcM mantenido en hielo ($IMF_{máx.}$) usando la fórmula $[(IMF_{máx.} - IMF_{fondo}) - (IMF_{experimental} - IMF_{fondo})] / (IMF_{máx.} - IMF_{fondo}) \times 100$.

5 Se había mostrado previamente que ROR1 humano media en la internalización de IgG policlonal de cabra anti-ROR1 humano mediante una ruta que puede bloquearse por completo mediante el inhibidor de la endocitosis óxido de fenilarsina (Baskar *et al.*, Clin. Cancer Res., 14(2): 396-404 (2008)). Se observó la reducción de IMF para los tres IgG1 después de 2 h (figura 10B). En el caso de R11 y R12 de IgG1, el óxido de fenilarsina bloqueó por completo la reducción de IMF, revelando la internalización como factor dominante. En cambio, la disociación contribuyó a la desaparición continua de Y31 de IgG1 de la superficie celular (figura 10B).

10 R12 de IgG1 se internalizó más lentamente que R11 de IgG1 con picos al 20-25% después de 2 h en comparación con el 50-55%.

Estos resultados proporcionan evidencias de que la presencia más duradera de R12 de IgG1 en la superficie celular contribuye a la actividad ADCC más débil observada para R12 de IgG1 que no se detectó para R11 e Y31 de IgG1.

15 EJEMPLO 8

Este ejemplo demuestra la construcción y caracterización de un fragmento estabilizado por puentes disulfuro (dsFv) de anticuerpos anti-ROR1 de conejo/ser humano quiméricos R11, R12 e Y31 fusionados a una inmunotoxina.

Se genera un fragmento dsFv de AcM R11, R12 o Y31 (dsFv) y se fusiona a un fragmento de 38 kDa de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38) generalmente según métodos descritos en Pastan *et al.*, Methods Mol. Biol, 248: 503-518 (2004). Se alteran las secuencias codificantes de VH y VL originales de R11, R12 o Y31 (véase la figura 2) según sea necesario para preparar un fragmento dsFv. Se subclona la secuencia codificante de VH alterada en marco con una secuencia codificante de PE38 en un vector pRB98 que porta un gen de resistencia a cloranfenicol (el vector se describe en Kreitman *et al.*, en Drug Targeting, Francis *et al.*, Eds., vol. 25, págs. 215-226, Humana Press Inc, Totowa, N.J., 2000). Se expresan por separado las cadenas VH y VL alteradas en *E. coli*, y se recogen y solubilizan las proteínas resultantes. Se repliegan VH y VL entre sí para formar la inmunotoxina de fusión dsFv-PE38, que se purifica mediante intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel tal como se describe en Pastan *et al.*, citado anteriormente, 2004.

Se evalúan los conjugados de inmunotoxina dsFv-PE38 recombinantes resultantes mediante citometría de flujo y se comparan con anticuerpos anti-ROR1 de conejo/ser humano quiméricos R11, R12 e Y31 para determinar su capacidad para unirse a las líneas celulares de linfoma de células del manto que expresan ROR1 humano, JeKo-1 y HBL-2. Se detecta la unión a las células JeKo-1 y HBL-2 por los AcM R11, R12 e Y31 usando un anticuerpo policlonal (AcP) de cabra anti-IgG de ratón conjugado con APC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a una dilución 1:300. Se detecta la unión a las células JeKo-1 y HBL-2 de los conjugados de inmunotoxina dsFv-PE38 usando AcP de conejo anti-exotoxina A de *Pseudomonas* (dilución 1:100) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como anticuerpo secundario y AcP de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Cy5 (dilución 1:300) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) como anticuerpo terciario. Se espera que los resultados demuestren que, a pesar de la monovalencia inherente de una inmunotoxina dsFv-PE38 recombinante, la unión a ROR1 de superficie celular nativo sea detectable a bajas concentraciones.

Se espera que un análisis de la unión de la inmunotoxina dsFv-PE38 a PBMC de pacientes con LLC-B muestre resultados similares. Adicionalmente, se espera que experimentos de ELISA demuestren que la inmunotoxina dsFv-PE38 conserva especificidad de unión por el dominio extracelular de ROR1 humano.

El ejemplo anterior proporciona un método de preparación de un anticuerpo conjugado con inmunotoxina recombinante de la invención, que se basa en los AcM R11, R12 o Y31, y que tiene especificidad de unión conservada por ROR1, incluyendo ROR1 nativo expresado en la superficie celular de células B malignas.

45 EJEMPLO 9

Este ejemplo demuestra las propiedades citotóxicas de dsFv de los anticuerpos anti-ROR1 de conejo/ser humano quiméricos R11, R12 e Y31 fusionados a una inmunotoxina aplicada a células que expresan ROR1.

Se cultivan células JeKo-1 y HBL-2 en medio 1640 de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complementado con suero de ternero fetal al 10% y se incuban durante 48 horas at 37°C en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con diversas dosis (0-100 µg/ml) de la inmunotoxina dsFv-PE38 preparada en el ejemplo 8. Posteriormente, se analizan las células mediante citometría de flujo usando anexina V y yoduro de propidio para teñir las células apoptóticas y muertas, respectivamente. Se evalúa el porcentaje de células positivas tanto para anexina V como para yoduro de propidio en función de la concentración de dsFv-PE38. La citotoxicidad de dsFv-PE38 incluye no sólo la muerte celular (necrosis) tal como se evidencia mediante la tinción con yoduro de propidio, sino también una apoptosis extensa, tal como se evidencia mediante la tinción con anexina V.

El ejemplo anterior proporciona un método de evaluación de la capacidad de un anticuerpo conjugado con inmunotoxina recombinante de la invención, que se basa en los AcM R11, R12 o Y31, para realizar una destrucción dependiente de la dosis de células de JeKo-1 y HBL-2 a bajas concentraciones.

EJEMPLO 10

5 Este ejemplo demuestra la capacidad de R11, R12 e Y31 de IgG1 para inducir o inhibir la apoptosis en células de LLC primarias de pacientes.

Se evaluó la apoptosis en presencia y ausencia de suero bovino fetal (FBS). Se ha mostrado que FBS potencia la apoptosis espontánea de células de LLC primarias *ex vivo* (Levesque *et al.*, Leukemia, 15: 1305-1307 (2001)). Usando medio libre de FBS, se analizó la inducción de apoptosis en PBMC de tres pacientes con LLC con el 80% o más de células CD19+ CD5+ ROR1+ tras la incubación durante tres días con R11, R12, Y31, TT11 de IgG1 y rituximab solo o en presencia de un AcP de reticulación. Se distribuyeron PBMC de pacientes con LLC en placas de fondo plano de 48 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en o bien (i) medio AIM-V libre de suero (Invitrogen) complementado con β -mercaptoetanol 50 μ M (Sigma-Aldrich) o bien (ii) RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (v/v), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 μ g/ml en presencia o ausencia de IL-4 humana recombinante 100 ng/ml (R&D Systems) y trímero de CD40L humano recombinante soluble 1 μ g/ml (Amgen, Thousand Oaks, CA). Se incubaron las células con 5 μ g/ml de R11, R12, Y31, TT11 de IgG1 o rituximab a 37°C en el 5% de CO₂. Para la reticulación, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG humana-F(ab')₂ 20 μ g/ml (específico de Fc, Jackson ImmunoResearch Laboratories) a la suspensión celular simultáneamente con anticuerpos primarios. Se midió la apoptosis y muerte celular mediante citometría de flujo tras tinción con Alexa Fluor 647-anexina V (Invitrogen) y tinción verde de ácidos nucleicos SYTOX (Invitrogen). En resumen, se recogieron suavemente las células después de incubación durante 72 h con los tratamientos indicados, se lavaron una vez con tampón de unión de apoptosis frío (NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4), y se resuspendieron en 200 μ l de tampón de unión de apoptosis. Después de añadir 1 μ l de Alexa Fluor 647-anexina V y 1 μ l de verde de SYTOX hasta una concentración final de 50 nM, se incubaron las células durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se resuspendieron en 400 μ l de tampón de unión de apoptosis, y se analizaron usando un instrumento FACSCalibur y software analítico FlowJo.

Tal como se muestra en la figura 11A, se observó el único aumento de la apoptosis espontánea para rituximab reticulado. Esto fue sistemático y reproducible para las tres muestras de PBMC sometidas a prueba. En presencia de FBS, la apoptosis se aproximó al 50% después de tres días (figura 11B). Tal como se observó previamente, la adición de IL-4 y CD40L suprimió fuertemente la apoptosis. Véase, por ejemplo, Baskar *et al.*, Clin. Cancer Res., 14: 396-404 (2008). R11, R12, Y31 y TT11 de IgG1 (control negativo) ni aumentaron ni disminuyeron la apoptosis solos ni después de reticulación. Tampoco influyeron en la supresión de la apoptosis mediante IL-4 y CD40L. En cambio, se encontró que rituximab reticulado aumentaba la apoptosis y anulaba parcialmente su supresión (figura 11B).

También se investigó la inducción de apoptosis en la línea celular de LCM HBL-2 (datos no mostrados). En contraposición a las células de LLC primarias, rituximab solo fue suficiente para inducir apoptosis en células HBL-2. Esta actividad aumentó adicionalmente después de la reticulación. No obstante, R11, R12 e Y31 de IgG1 no indujeron apoptosis en células HBL-2 con o sin reticulación.

Estos resultados demuestran que este panel de anticuerpos IgG1 conejo/ser humano quiméricos ni induce ni inhibe la apoptosis de células de LLC primarias.

40

Lista de secuencias

<110> LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, REPRESENTADOS POR EL SECRETARIO, DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS SOCIALES

<120> ANTICUERPOS CONTRA ROR1 DE CONEJO/SER HUMANO QUIMÉRICOS

45 <130> 709098

<150> Documento US 61/418.550

<151> 01-12-2010

<160> 53

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1

<211> 110

ES 2 657 970 T3

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 1

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Thr Ser Gly Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Arg
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Val Gly Asn Val Ser
85 90 95

Tyr Arg Thr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

5 <210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 2

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu Val Thr Pro Ala Gly Asn
1 5 10 15

10 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser Asp Ile Asn Asp Tyr Pro
20 25 30

ES 2 657 970 T3

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Val Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr
 85 90 95

Ser Thr Tyr Tyr Cys Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Ile Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 3

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Ala Ala Leu Gly Ser
 1 5 10 15

Pro Ala Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr
 20 25 30

Ile Asp Trp Tyr Gln Gln Leu Gln Gly Glu Ala Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45

Gln Val Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Pro
 65 70 75 80

Ser Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Asp Tyr
 85 90 95

Ile Gly Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly
 100 105 110

<210> 4

<211> 121

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 657 970 T3

<400> 4

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val
50 55 60

Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Asp
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Arg Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile Trp Gly
100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 108

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 5

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Arg
65 70 75 80

ES 2 657 970 T3

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Leu Ser Asn Ser Asp
85 90 95

Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Leu
100 105

<210> 6

<211> 117

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 6

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Asn Ser His Trp
20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Ala Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg Ile Ala
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Tyr
85 90 95

Gly Asp Tyr Arg Leu Val Thr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 23

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 7

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Thr Ser Gly Ala Val Gly
1 5 10 15

15

ES 2 657 970 T3

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
20

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 8

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

10 <210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintética

<400> 9

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 10

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 10

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
1 5 10

25 <210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Sintética

ES 2 657 970 T3

<400> 11

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Ala Ala Leu Gly Ser
1 5 10 15

Pro Ala Lys Ile Thr Cys
20

<210> 12

5 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10 <400> 12

Trp Tyr Gln Gln Leu Gln Gly Glu Ala Pro Arg Tyr Leu Met Gln Val
1 5 10 15

Gln Ser Asp

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 13

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr
1 5 10 15

Leu Ile Ile Pro Ser Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

20 <210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintética

<400> 14

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly
1 5 10

<210> 15

<211> 23

30 <212> PRT

ES 2 657 970 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 15

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

5 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
20

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Sintética

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17

15 <211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

20 <400> 17

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 18

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Leu
1 5 10

ES 2 657 970 T3

<210> 19

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Sintética

<400> 19

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu Val Thr Pro Ala Gly Asn
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser Asp Ile Asn
20 25

<210> 20

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

15 <400> 20

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 21

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
1 5 10 15

Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

25 <210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Sintética

ES 2 657 970 T3

<400> 22

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
1 5 10

<210> 23

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 23

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

10 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
20 25 30

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Sintética

<400> 24

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala
1 5 10

<210> 25

20 <211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

25 <400> 25

Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Asp Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Arg Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 26

5 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
 1 5 10

<210> 27
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 27

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Asn
 20 25

<210> 28

15 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética

20 <400> 28

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 29
 <211> 30
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 29

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

30 <210> 30

- <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Sintética
 <400> 30
 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 31
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Asn Leu Ala
 1 5 10
 15 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sintética
 <400> 32
 Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 33
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 30 <400> 33
 Leu Gly Gly Val Gly Asn Val Ser Tyr Arg Thr Ser
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 34

5 Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr Ile Asp
1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Sintética

<400> 35

Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro

1 5

15 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Sintética

<400> 36

Gly Ala Asp Tyr Ile Gly Gly Tyr Val

1 5

<210> 37

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 37

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala

30 1 5 10

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 38

Tyr Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

5 <210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintética

<400> 39

Leu Gly Ser Leu Ser Asn Ser Asp Asn Val
 1 5 10

<210> 40

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 40

20 **Asp Tyr Pro Ile Ser**
 1 5

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Sintética

<400> 41

Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 42

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 42

Gly Tyr Ser Thr Tyr Tyr Cys Asp Phe Asn Ile
1 5 10

<210> 43

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 43

10 Ala Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Sintética

<400> 44

Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn
1 5 10 15

Gly

20 <210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintética

<400> 45

Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile
1 5 10

<210> 46

<211> 5

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 46

Ser His Trp Met Ser
1 5

<210> 47

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 47

10 **Ile Ile Ala Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly**
1 5 10 15

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Sintética

<400> 48

Asp Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Val Thr Phe Asn Ile
1 5 10

<210> 49

20 <211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

25 <400> 49

gaggaggagc tcaactcccag tcggtgaagg agtcccga 37

<210> 50

<211> 59

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 50

ccgatggggcc cttggtggag gctgaggaga tggtgaccag ggtgcctggt cccagatg 59

ES 2 657 970 T3

<210> 51
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Sintética
<400> 51
gaggagaagc ttgttgctct ggatctctgg tgcctacggg gaactcgtgc tgactcagtc 60
<210> 52
10 <211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintética
15 <400> 52
attggatgca taatagatca gtagcttggg aggctg 36
<210> 53
<211> 30
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintética
<400> 53
aaccagggca gcctccaag ctactgatct 30
25

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que tiene especificidad por el dominio extracelular del receptor huérfano 1 similar a tirosina quinasa receptora (ROR1) humano, que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, y en el que las seis CDR se seleccionan del grupo que consiste en:
 - 5 (a) SEQ ID NO: 31-33 y SEQ ID NO: 40-42;
 - (b) SEQ ID NO: 34-36 y SEQ ID NO: 43-45; y
 - (c) SEQ ID NO: 37-39 y SEQ ID NO: 46-48.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende:
 - 10 (a) un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
 - (b) un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o
 - 15 (c) un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
3. Anticuerpo según la reivindicación 2, en el que
 - 20 (a) el dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,
 - (b) el dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o
 - (c) el dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 25 4. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
5. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo se conjuga con una molécula sintética.
- 30 6. Anticuerpo según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un cuerpo T y la molécula sintética comprende una región transmembrana y un dominio de señalización de receptor de células T (TCR) intracelular.
7. Anticuerpo según la reivindicación 5, en el que la molécula sintética es un marcador, un agente citotóxico, un radioisótopo terapéutico o un liposoma.
8. Anticuerpo según la reivindicación 7, en el que el agente citotóxico es una toxina.
- 35 9. Anticuerpo según la reivindicación 7, en el que la toxina es un fragmento de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE).
10. Anticuerpo según la reivindicación 9, en el que la toxina es PE38.
11. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 12. Kit que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
13. Kit según la reivindicación 12, que comprende además uno o más tampones de inmunoensayo.
14. Uso del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la preparación de un medicamento para destruir o inhibir el crecimiento de células que expresan ROR1 en un sujeto.
- 45 15. Uso del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o un estado asociado con la expresión elevada de ROR1 en un sujeto.

16. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso para destruir o inhibir el crecimiento de células que expresan ROR1 en un sujeto o para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con la expresión elevada de ROR1 en un sujeto.
- 5 17. Método *in vitro* de detección de un nivel alterado de ROR1 en una muestra de prueba, método que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de prueba obtenida de un sujeto con el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10;
- (b) determinar el nivel de ROR1 en la muestra de prueba; y
- 10 (c) comparar el nivel de ROR1 en la muestra de prueba con un nivel de control de ROR1 para determinar de ese modo si el nivel de ROR1 en la muestra de prueba está alterado con relación al nivel de control de ROR1.
18. Método según la reivindicación 17, en el que el nivel de ROR1 en la muestra de prueba del sujeto que es mayor que el nivel de control es indicativo de una enfermedad o un estado asociado con la expresión elevada de ROR1 en el sujeto.
- 15 19. Uso según la reivindicación 15 ó 16 o método según la reivindicación 17, en el que la enfermedad o el estado asociado con la expresión elevada de ROR1 es un cáncer de células B, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer colorrectal o cáncer de mama, preferiblemente la enfermedad o el estado es leucemia linfocítica de células B (LLC-B) o linfoma de células del manto (LCM).
- 20 20. Uso del anticuerpo según la reivindicación 7 en la preparación de un medicamento para detectar un tumor que expresa ROR1, en el que el medicamento es adecuado para la administración a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener un tumor que expresa ROR1, para la obtención de imágenes del sujeto para una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado, en el que la densidad o concentración es con relación a (i) el fondo en tejido proximal o (ii) la densidad o concentración detectada previamente en la misma región del sujeto, de tal manera que la existencia de una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado es una indicación de la presencia de un tumor que expresa ROR1 en el sujeto.
- 25 21. Anticuerpo según la reivindicación 7 para su uso en la detección de un tumor que expresa ROR1, en el que el medicamento es adecuado para la administración a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener un tumor que expresa ROR1, para la obtención de imágenes del sujeto para una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado, en el que la densidad o concentración es con relación a (i) el fondo en tejido proximal o (ii) la densidad o concentración detectada previamente en la misma región del sujeto, de tal manera que la existencia de una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado es una indicación de la presencia de un tumor que expresa ROR1 en el sujeto.
- 30 22. Uso según la reivindicación 20 o anticuerpo para su uso según la reivindicación 21, en el que la existencia de una región de densidad o concentración alterada de marcador conjugado es una indicación de la presencia de un tumor de células B que expresa ROR1 en el sujeto; preferiblemente el tumor de células B que expresa ROR1 es una leucemia linfocítica de células B (LLC-B) o un tumor de linfoma de células del manto (LCM).
- 35 40

Fig. 1

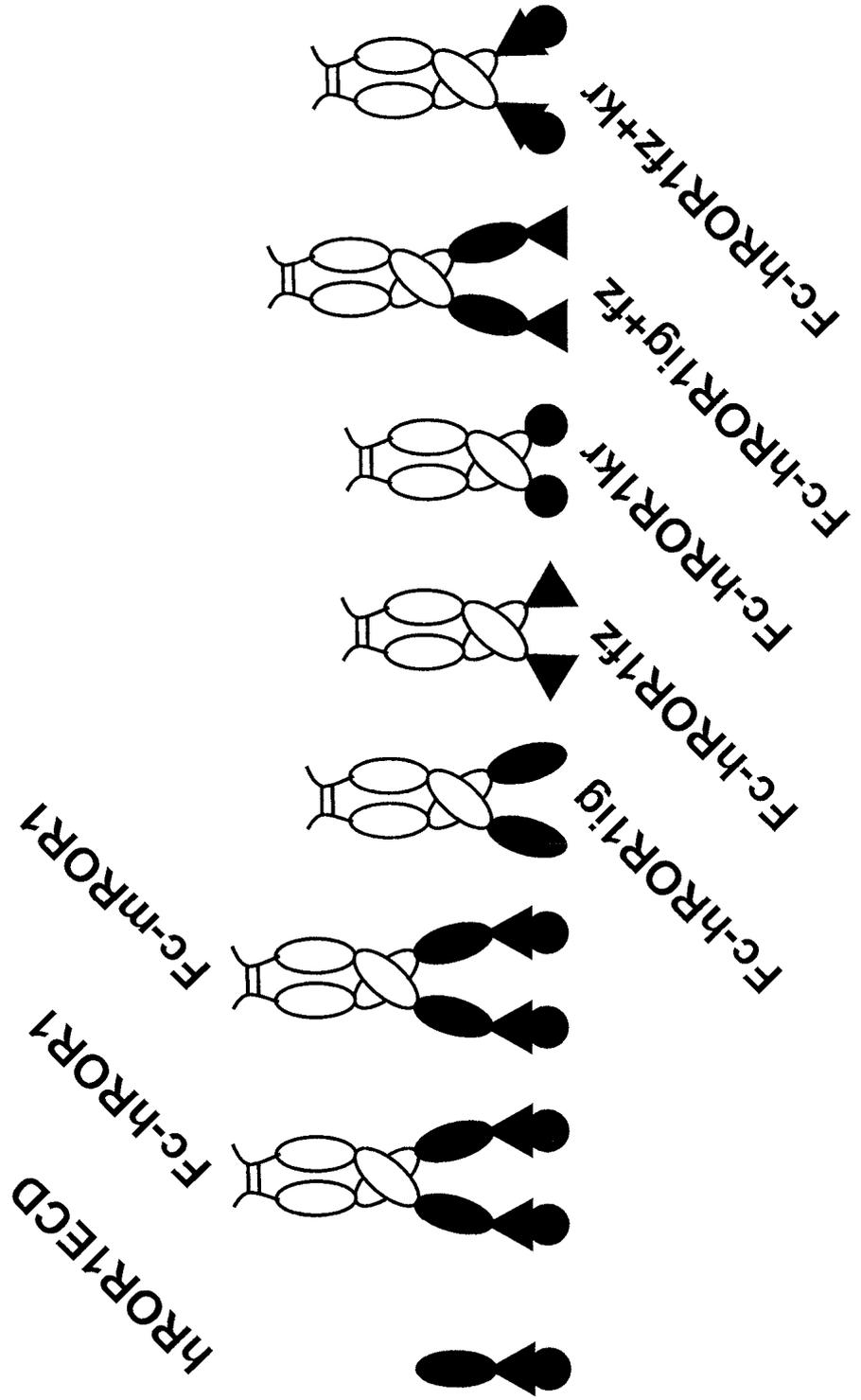


Fig. 2

V_L	FRI	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	23	35	49	57	88	98	107
R11	ELVMTQTPSSSTSGAVGGTVIINC QASQSIDSNLA WFQOKPQQPPILLIY RASNLAS GVPFRFSGSFGTEYILTISGQVREDAATYYC LGGVGNVSYRTS FGGGTEVWVK SEQ ID NO:1						
Y31	ELVMTQTPSSVSAWGGTVIINC QASQSIGSYLA WFQOKPQQPPKLLIY YASNLAS GVPFRFSGSFGTEYILTISGQVREDAATYYC LGSLSWEDWV--- FGGGTELEIL SEQ ID NO:5						
V_L	FRI	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	23	35	49	57	88	98	107
R12	ELVLTQSPVSAALGSPAKITC TLSSAHKTDITD WYQQLQCEAPRVLQMQVSD CEYTKRP GVPDRFSGSSSGADRYLLIIPSVQADDEADYVC GADYIGGW FGGGTQLTVTG SEQ ID NO:3						
V_H	FRI	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	30	36	49	66	94	103	113
R11	-QSVKESGGLVTPAGNLIILTCTASGSDIN DYPIS WYRQAFKGLKLEWIG FIN-SGGSTWVASWVKG RFTLSKST--TVDLKMISLITDDTATYFCAR GYTIWGD-FNI WGFGLVTVISS SEQ ID NO:2						
R12	QKQLVESGGRLVTPGGSLTILSKASGDFPS AYYMS WYRQAFKGLKLEWIA TIYPSSGKTYATWVWG RFTIISDNAMQIVDLMNSLTAADRAITYFCAR DSYADDGALFNI WGFGLVTVISS SEQ ID NO:4						
Y31	-QSLEESGGRLVTPGTPILTICTVSGIDIN SHHMS WYRQAFKGLKLEWIG IIA-ESGSTTYANWAKG RFTLSKST--TVDLRLASPTTIEDTATYFCAR DYGDYRLVTFNI WGFGLVTVISS SEQ ID NO:6						

Fig. 3

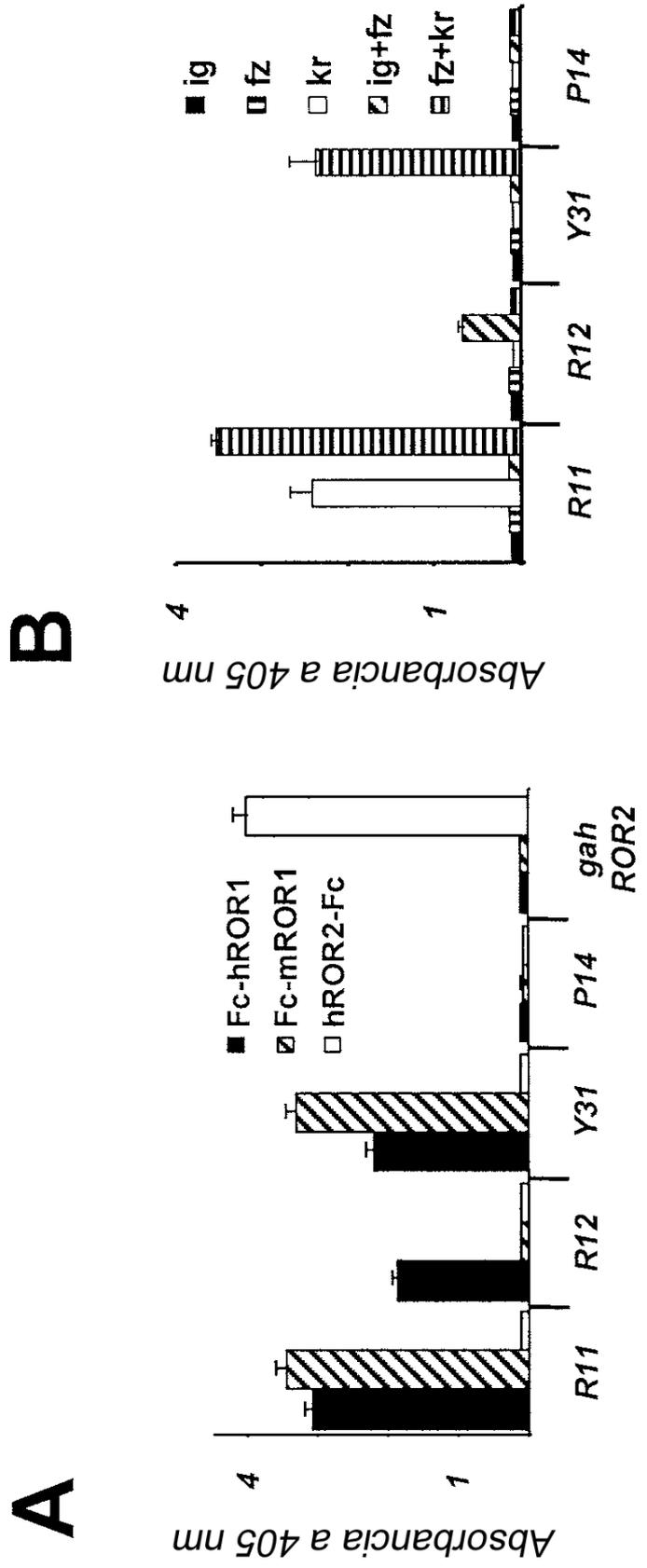


Fig. 4

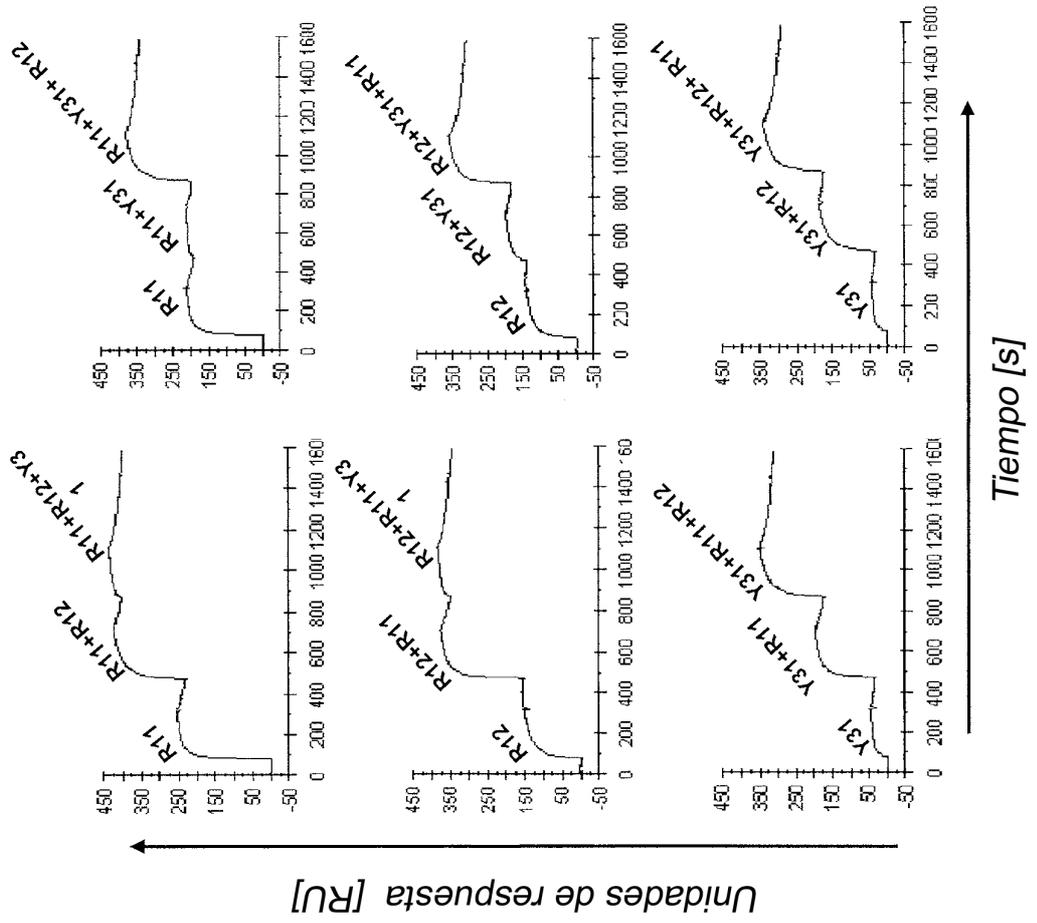


Fig. 5

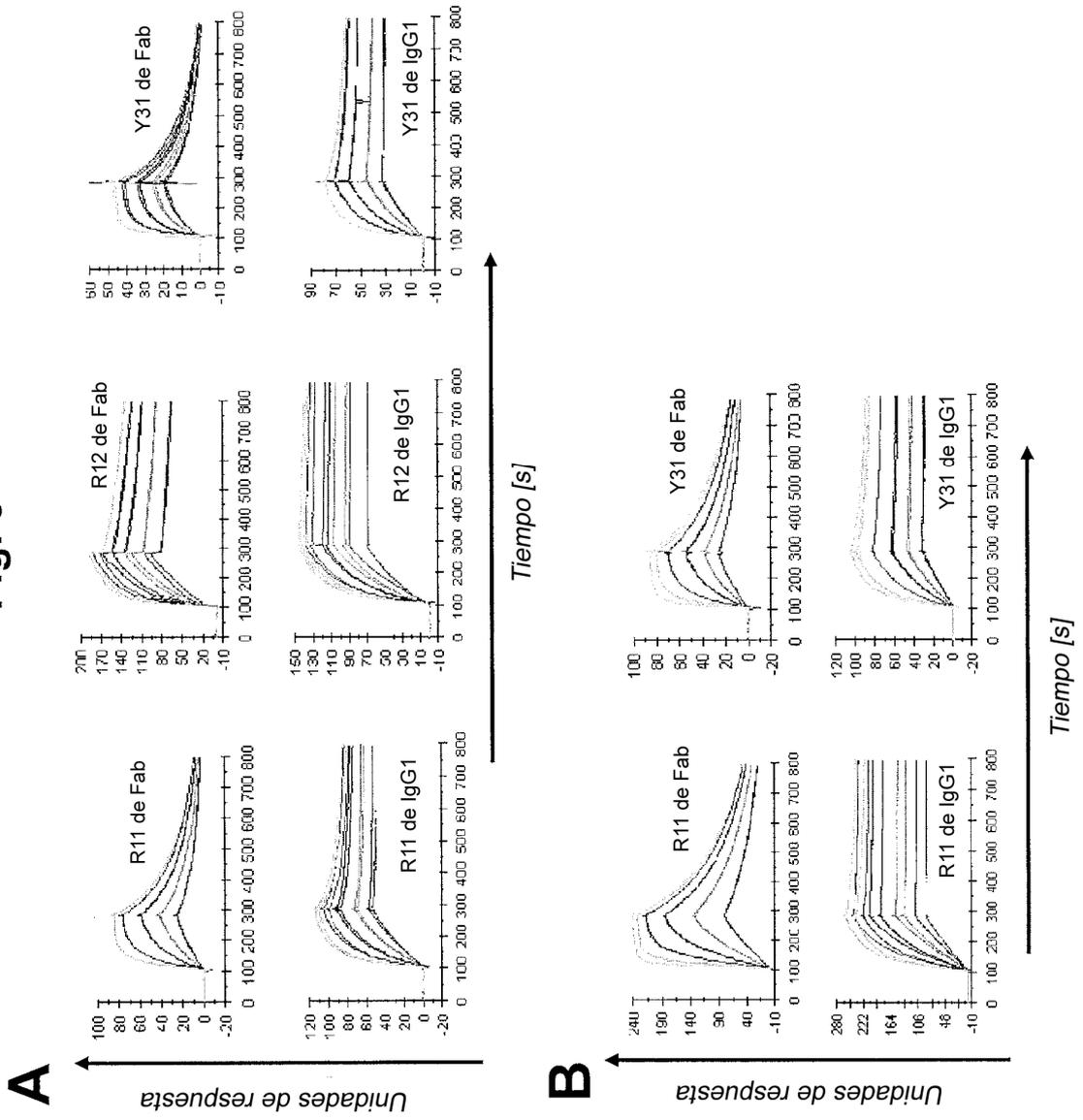
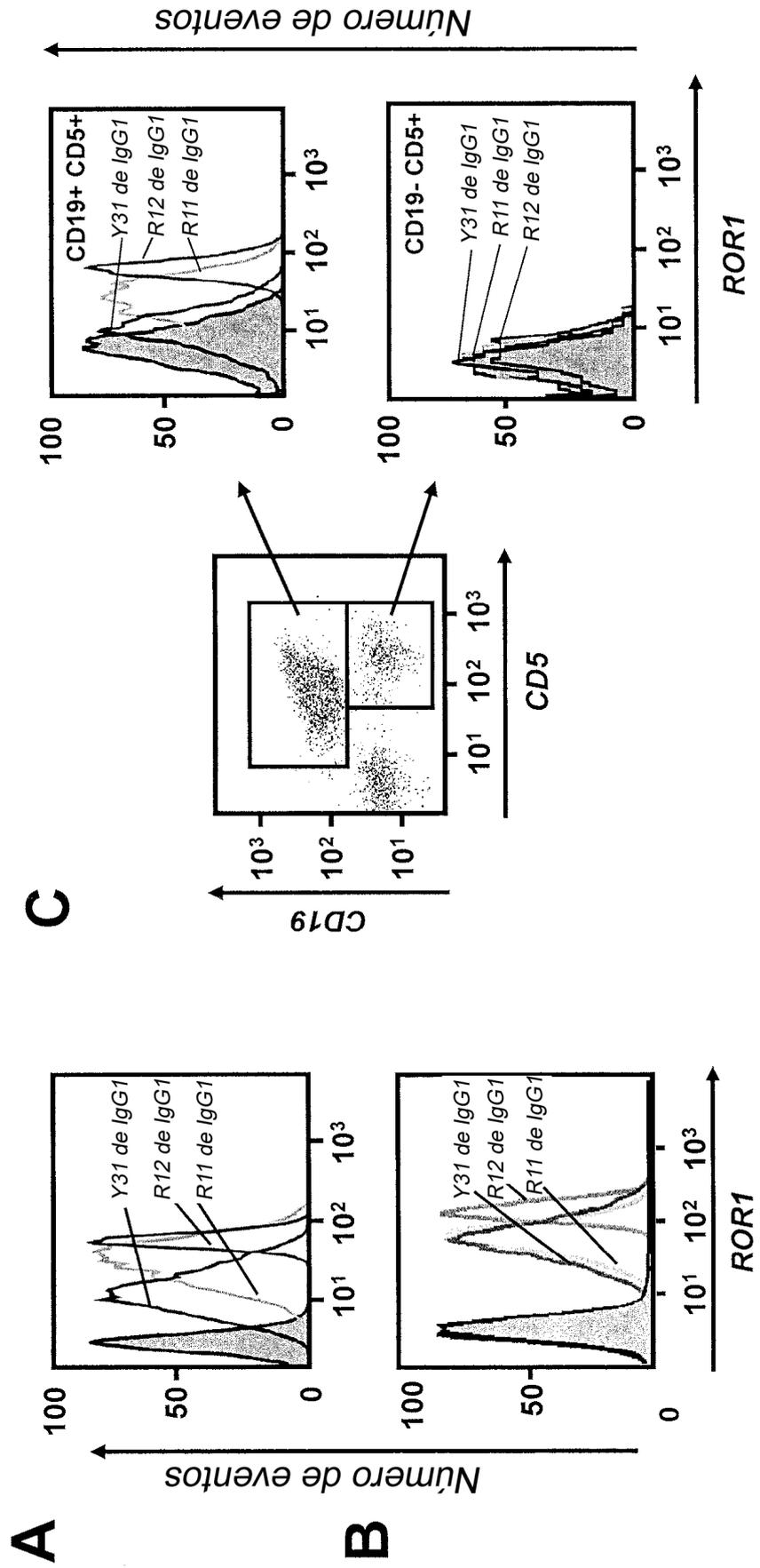


Fig. 6



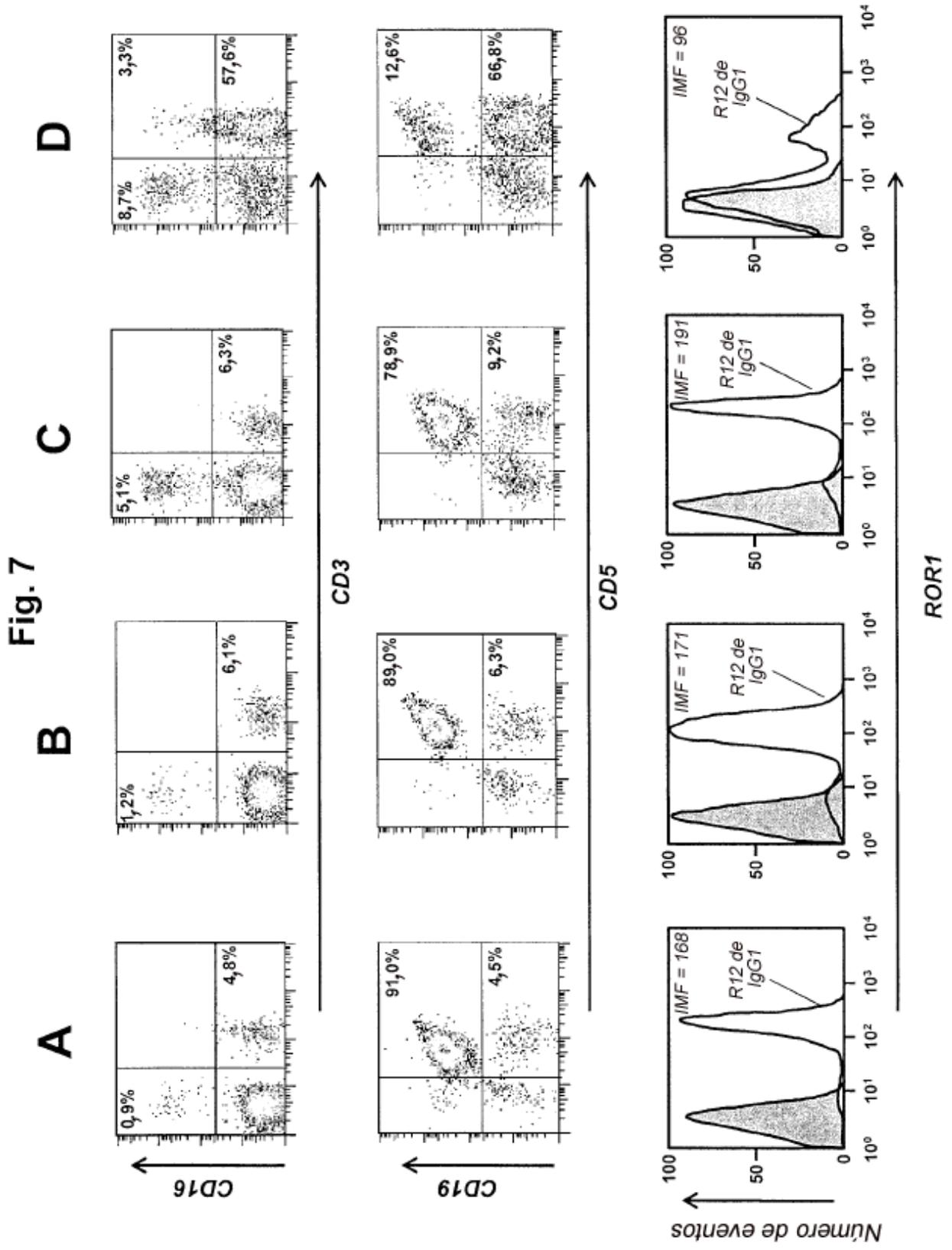
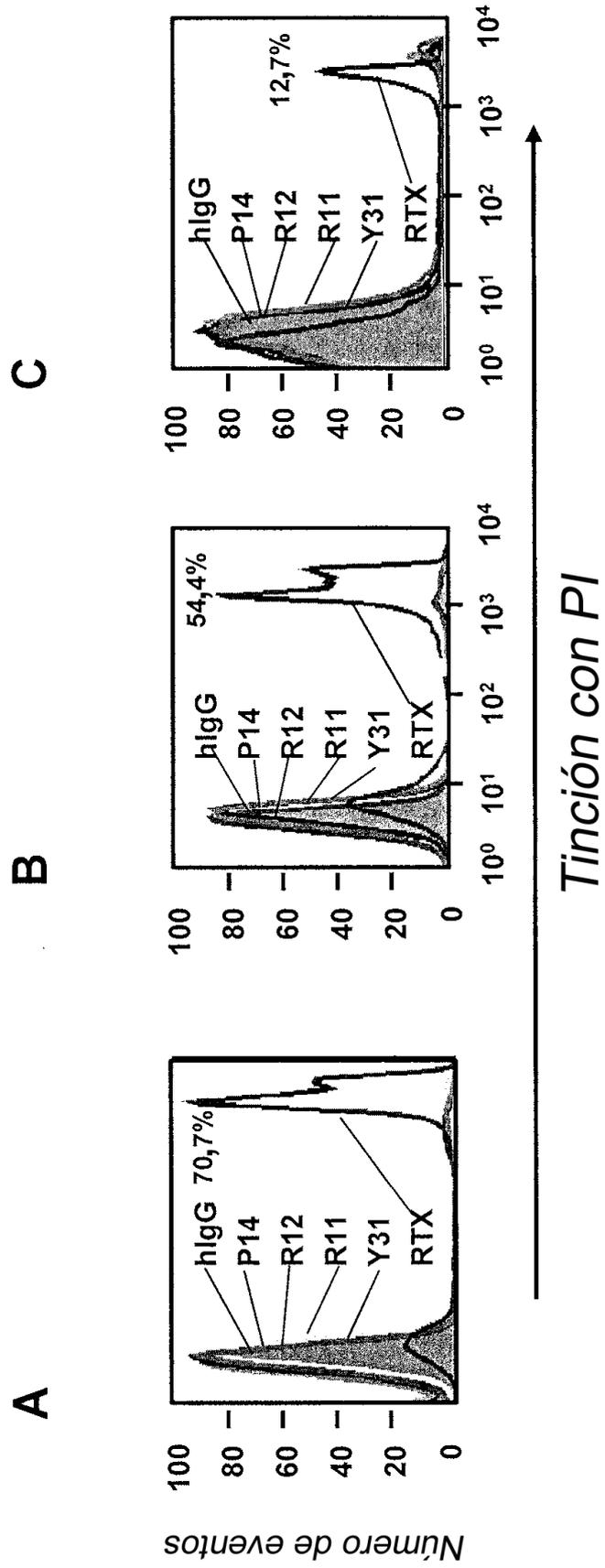


Fig. 8



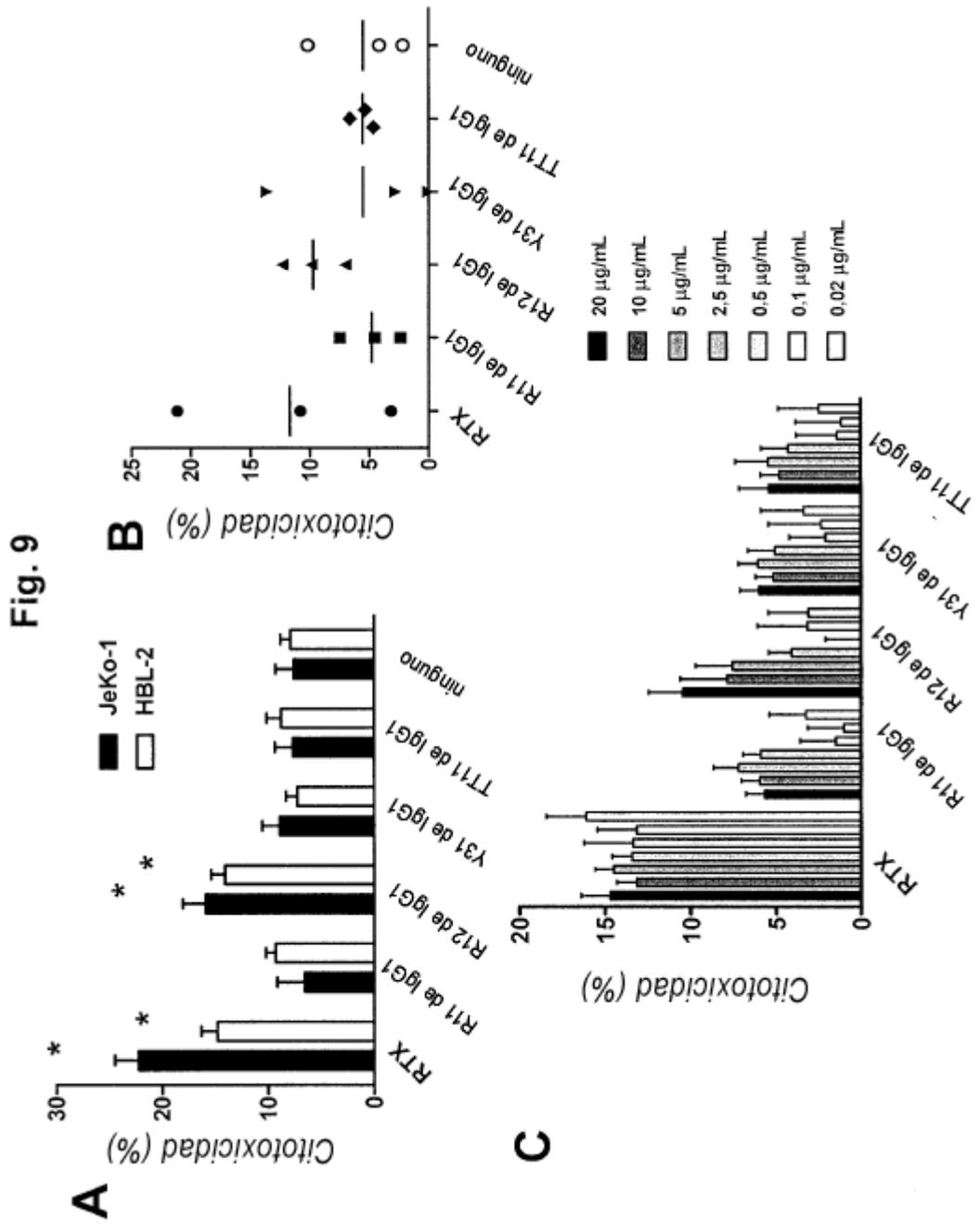


Fig. 10

