

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 315**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/032572**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13831099 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2888283**

54 Título: **Anticuerpos y vacunas para su uso en tratar cánceres ROR1 e inhibir metástasis**

30 Prioridad:

24.08.2012 US 201261693230 P

02.10.2012 US 201261709055 P

04.10.2012 US 201261709803 P

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

28.02.2019

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)

**1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

KIPPS, THOMAS, JAMES;

YU, JIAN;

CUI, BING;

CHEN, LIGUANG;

WIDHOPF, GEORGE y

PRUSSAK, CHARLES

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 702 315 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 y vacunas para su uso en tratar cánceres ROR1 e inhibir metástasis

5 Información sobre subvenciones

Esta invención se hizo con apoyo gubernamental bajo P01-CA081534 y R37-CA049870 otorgados por los Institutos Nacionales de Salud y DR1-01430 Instituto de Medicina Regenerativa de California. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10

Campo de la invención

La invención se refiere en general a anticuerpos contra el receptor huérfano de tipo receptor tirosina quinasa 1, así como a métodos para inhibir metástasis.

15

Información preliminar

El cáncer es la segunda causa principal de muerte humana después de la enfermedad coronaria. A nivel mundial, millones de personas mueren de cáncer cada año. En los Estados Unidos solo, el cáncer produce la muerte de bastante más de medio millón de personas anualmente, con unos 1,4 millones de casos nuevos diagnosticados por año. Mientras que las muertes de enfermedad cardiaca han ido disminuyendo significativamente, las resultantes de cáncer en general están en aumento. Los receptores tirosinas quinasa (RTK) desempeñan papeles críticos en diferenciación celular, proliferación, migración, angiogénesis y supervivencia. El receptor huérfano de tipo receptor tirosina quinasa 1 (ROR1) es una proteína de membrana de tipo I evolutivamente conservada que pertenece a la subfamilia ROR y tiene dominios extracelulares que contienen dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), Frizzled y Kringle. Los ratones deficientes de ROR1 presentan una variedad de defectos fenotípicos en los sistemas esquelético y urogenital, así como retraso de crecimiento posnatal. ROR1 se expresa durante la embriogénesis y por una variedad de cánceres diferentes, pero no por tejidos posparto normales, y se puede considerar un antígeno de superficie oncoembrionario. Los datos funcionales sugieren que ROR1 puede funcionar en la señalización de WTN no canónica para fomentar la supervivencia de células malignas. Estudios más recientes han mostrado que la señalización de WTN no canónica desempeña un papel principal en metástasis de tipo basal y otros subtipos de cáncer de mama. La expresión de ROR1 en cáncer de mama humano también se asocia con activación de la ruta AKT-CREB y crecimiento aumentado de células tumorales.

20

25

30

35

40

45

El receptor huérfano de tipo receptor tirosina quinasa 1 (ROR1) es una proteína embrionaria conservada cuya expresión se reduce progresivamente durante el desarrollo embrionario en mamíferos. La proteína intacta, incluyendo su dominio extracelular, no parece estar significativamente expresada en tejidos normales, adultos de mamífero. En particular, estudios no han identificado expresión significativa de ROR1 en la superficie celular de tejidos humanos adultos normales, incluyendo células B no cancerosas normales (Baker et al., Clin. Cancer Res., 14:396 (2008); DaneshManesh et al., Int. J. Cancer, 123:1190 (2008) y Fukuda et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 105:3047 (2008)). Sin embargo, ROR1 se expresa en la superficie celular de células B malignas (B-LLC) y linfoma de células del manto (LCM). También se ha descrito que ROR1 se expresa en ciertas otras líneas celulares de cáncer incluyendo linfoma de Burkett, carcinoma de células renales, cáncer de colon y cáncer de mama (Solicitud de patente en los EE UU 2007/02075110). Por tanto, ROR1 se puede considerar un marcador selectivo para estos cánceres.

El documento WO 2012/097313 divulga el Acm D10. El anticuerpo se une a los residuos 130-165 de huROR1, específicamente al péptido VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC, tiene una KD de 40 nM y se puede usar para tratar cáncer y metástasis.

50 Compendio de la invención

La invención proporciona anticuerpos contra ROR1 como se definen en las reivindicaciones que pueden inhibir el crecimiento de células de cáncer y metástasis. Esta invención proporciona anticuerpos contra ROR1, péptidos de unión a ROR1. Se proporcionan además composiciones y los anticuerpos de la invención para uso en métodos de inhibir metástasis usando anticuerpos anti-ROR1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o inmunoconjugados de anticuerpos contra ROR1. La invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 humana aislado que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde dicha región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 como se muestra en SEQ ID NO: 27, una CDR2 como se muestra en SEQ ID NO: 28, una CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 29 y en donde dicha región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 como se muestra en SEQ ID NO: 30, una CDR2 como se muestra en SEQ ID NO: 31, y una CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 32.

55

60

También se proporciona en el presente documento un anticuerpo anti-ROR1 humana aislado que tiene la misma especificidad de unión que el anticuerpo 99961. En un aspecto, el anticuerpo se une al dominio de tipo Ig, que está contiguo al dominio CRD de ROR1 humana (hROR1). También se proporciona en el presente documento que el anticuerpo se une a un epítipo que mapea en los aminoácidos 42-160 de hROR1. En un aspecto adicional, el

65

anticuerpo se une a un epítipo que mapea en los aminoácidos 130-160 de hROR1. En otro aspecto, el anticuerpo requiere la presencia de ácido glutámico en la posición 138 de hROR1 para la unión.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 humana aislado que comprende una región variable de la cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 17, y la región variable de la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19. En un aspecto, el anticuerpo según la región variable de la cadena pesada es SEQ ID NO: 5 y la región variable de la cadena ligera es SEQ ID NO: 7.

La invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 humana aislado que comprende una región variable de la cadena pesada compuesta de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, y la región variable de la cadena ligera compuesta de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32. La región variable de la cadena pesada compuesta de CDR1, CDR2 y CDR3 está compuesta de SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, y la región variable de la cadena ligera compuesta de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 humana aislado con una afinidad de unión mayor de 41 nM. En un aspecto, la afinidad de unión del anticuerpo es entre aproximadamente 500 pM y aproximadamente 6 nM. En un aspecto, la afinidad de unión del anticuerpo es aproximadamente 800 pM.

En un aspecto el anticuerpo es 99961 o formas humanizadas del mismo, incluyendo los anticuerpos 99961.1, 99961.2, 99961.3 o 99961.4. En otro aspecto, el anticuerpo inhibe metástasis. En un aspecto adicional, el anticuerpo se internaliza e inhibe la migración celular. En un aspecto adicional, el anticuerpo se internaliza y disminuye vimentina, sanil1/2 o ZEB. En un aspecto preferido, el anticuerpo es humano, humanizado o quimérico.

En otra forma de realización, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo contra ROR1 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Una forma de realización adicional proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la invención contra ROR1. En otra forma de realización, la invención proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo contra ROR1. En una forma de realización adicional, la invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención contra hROR1. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método de producir un anticuerpo anti-ROR1 humana que comprende cultivar las células huéspedes en condiciones para producir el anticuerpo, después opcionalmente recuperar el anticuerpo.

También se proporciona en el presente documento una vacuna contra células que expresan ROR-1, la vacuna comprende una composición farmacéuticamente aceptable de un péptido aislado o producido sintéticamente que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia a la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10. También se proporciona en el presente documento que la secuencia de aminoácidos de la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10 es VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC. También se proporciona en el presente documento que la secuencia de aminoácidos de la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10 es EVVSSTGVLFVKFGPC. También se proporciona en el presente documento en el contexto de la invención que la célula que expresa ROR-1 es una célula cancerosa. También se proporciona en el presente documento en el contexto de la invención que la célula cancerosa es leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata, o suprarrenal.

También se proporciona en el presente documento una vacuna que comprende un péptido de unión a ROR1 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia a VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC y un soporte farmacéuticamente aceptable. En un aspecto de la divulgación, el péptido es de mamífero. En aspectos adicionales de la divulgación, el péptido de unión a ROR1 es quimérico y/o de origen humano, de ratón, rata, porcino, bovino, primate, felino, canino, de conejo, cabra, pollo o ursino. En otro aspecto de la divulgación, la vacuna comprende además un adyuvante inmunógeno. En un aspecto adicional de la divulgación, el adyuvante es una fracción soporte inmunógeno conjugada al péptido de unión. En un aspecto de la divulgación, la secuencia de aminoácidos del péptido de unión es VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC. En otro aspecto de la divulgación, la fracción soporte inmunógeno es un péptido soporte, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina, hidróxido de aluminio u otro adyuvante inmunitario farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar ejemplos de adyuvantes inmunitarios farmacéuticamente aceptables en *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 42: Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols; Editado por D. T. O'Hagan; Humana Press Inc., Totowa NJ y European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, Guidelines on Adjuvants in Vaccines, Londres 2004.

También se divulga una vacuna que comprende un péptido de unión a ROR1 que tiene una secuencia de aminoácidos con el menos el 95% de identidad de secuencia a EVVSSTGVLFVKFGPC y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional de la divulgación, el péptido de unión a ROR1 es quimérico y/o de origen humano, de ratón, rata, porcino, bovino, primate, felino, canino, de conejo, cabra, pollo o ursino. En un aspecto adicional de la divulgación, el adyuvante es una fracción soporte inmunógena conjugada al péptido de unión. En un aspecto de la divulgación, la secuencia de aminoácidos del péptido de unión es VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. En otro aspecto de la divulgación, la fracción soporte inmunógena es un péptido soporte, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina, hidróxido de aluminio u otro adyuvante inmunitario farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar ejemplos de adyuvantes inmunitarios farmacéuticamente aceptables en Methods in Molecular Medicine, Vol. 42: Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols; Editado por D. T. O'Hagan; Humana Press Inc., Totowa NJ y European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, Guidelines on Adjuvants in Vaccines, Londres 2004.

También se divulga en el presente documento una formulación farmacéutica que comprende la vacuna que comprende un péptido de unión a ROR1 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC y un soporte farmacéuticamente aceptable.

También se divulga en el presente documento una formulación farmacéutica que comprende la vacuna que comprende un péptido de unión a ROR1 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a EVVSSTGVLVFKFGPC y un soporte farmacéuticamente aceptable.

También se divulga en el presente documento un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26. En un aspecto de la divulgación, el péptido tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. En otro aspecto de la divulgación, el péptido tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a EVVSSTGVLVFKFGPC. En otro aspecto de la divulgación, el péptido de unión es de mamífero. En un aspecto adicional de la divulgación, el péptido de unión es quimérico y/o de origen humano, de ratón, rata, porcino, bovino, primate, felino, canino, de conejo, cabra, pollo o ursino.

También se divulga en el presente documento una formulación farmacéutica que comprende un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

También se divulga en el presente documento un ácido nucleico aislado que codifica un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26. También se divulga en el presente documento un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26. También se divulga en el presente documento una célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26. También se divulga en el presente documento un método para producir un péptido que comprende cultivar la célula huésped que codifica un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 en condiciones para producir el péptido de unión. En un aspecto de la divulgación, el método para producir un péptido comprende además recuperar el péptido de unión.

También se divulga en el presente documento un método de suprimir metástasis de cáncer que expresa ROR-1, el método comprende alterar la transición epitelial-mesenquimatosa de células tumorales administrando un anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal 99961, una vacuna compuesta de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10 o un péptido de unión a ROR-1 que tiene una secuencia con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. En un aspecto de la divulgación, el cáncer que expresa ROR-1 es leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata o suprarrenal.

También se divulga en el presente documento un método de suprimir metástasis de cáncer que expresa ROR-1, el método comprende alterar la transición epitelial-mesenquimatosa de células tumorales administrando un anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal 99961, una vacuna compuesta de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10 o un péptido de unión a ROR-1 que tiene una secuencia con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a EVVSSTGVLVFKFGPC. En un aspecto de la divulgación, el cáncer que expresa ROR-1 es leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata o suprarrenal.

También se divulga en el presente documento un método para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal 99961, una vacuna compuesta de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10 o un péptido de unión a ROR-1 que tiene una secuencia con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. En un aspecto

de la divulgación, el cáncer es leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata o suprarrenal.

5 También se divulga en el presente documento un método para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal 99961, una vacuna compuesta de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10 o un péptido de unión a ROR-1 que tiene una secuencia con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a EVVSSTGVLFVKFGPC. En un aspecto de la divulgación, el cáncer es leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata o suprarrenal.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra que la expresión de alto nivel de ROR1 en cáncer de mama está asociada con supervivencia sin metástasis más corta y firma génica TEM. (A) El gráfico se derivó de datos publicados disponibles a través de la base de datos PubMed GEO (GSE2603, GSE5327, GSE2034 y GSE12276). Las curvas de Kaplan-Meier representan el impacto pronóstico de la expresión de ROR1 en la supervivencia sin metástasis global. Para cada análisis, se segregaron 582 casos en terciles con el grupo designado ROR1H representando el tercio de los pacientes que tuvieron tumores con los niveles más altos del ARNm de ROR1, y el grupo designado ROR1L representando el tercio de pacientes que tuvieron cánceres con los niveles más bajos del ARNm de ROR1. El tercio de pacientes que tuvo tumores con expresión intermedia del ARNm de ROR1 se designó ROR1M. La supervivencia sin metástasis se determinó por análisis de Kaplan-Meier, y las diferencias estadísticas se determinaron por la prueba de orden logarítmico. El número de pacientes en cada categoría, los sucesos metastásicos totales, y los correspondientes valores de P (prueba chi cuadrado) se muestran en las tablas insertadas. (B) Mapa de calor que muestra la expresión de ROR1 (arriba), genes relacionados con TEM (SNAI1 y SNAI2 que codifican Snail1 y Snail2, ZEB1 que codifica ZEB-1, VIM que codifica vimentina, CDH2 que codifica N-cadherina, CDH1 que codifica E-cadherina, TJP1 que codifica ZO-1, TJP3 que codifica ZO-3, KRT19 que codifica CK-19, o CLDN3 que codifica claudina 3, en células de cáncer de mama primarias aisladas de pacientes. (C) Mapa de calor que muestra la expresión de genes relacionados con TEM aislados de células MDA-MB-231 (izquierda), HS-578T (medio), BT549 (derecha) tratadas con ARNip-ROR1 o ARNip-CTRL. (D) Inmunotransferencias de lisados de proteínas de MDA-MB-231, HS-578T o BT549 (como se indica en la parte inferior) transfectadas con ARNhc-ROR1 o ARNhc-CTRL, como se indica en la parte superior. Las inmunotransferencias se ensayaron con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas en la izquierda. (E) Inmunotransferencias de lisados de proteínas de MCF7 transfectadas con un vector control o un vector que expresa ROR1, como se indica en la parte superior. Las inmunotransferencias se ensayaron con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas en la izquierda.

La figura 2 muestra que la expresión de ROR1 por líneas celulares de cáncer de mama se asocia con características de TEM y mayor potencial metastásico. (A) Cambios morfológicos (40x) de MDA-MB-231, HS-578T o BT549 (como se indica a la izquierda) transfectadas con ARNhc-CTRL o ARNhc-ROR1, como se indica en la parte superior. (B) Se detectó la expresión de CK-19, E-cadherina, o vimentina por tinción de inmunofluorescencia en células MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CTRL o ARNhc-ROR1 a 63 aumentos. (C) Cambios morfológicos (40x) de células MCF7 transfectadas con vector control o vector que expresa ROR1 (como se indica en la parte superior). (D) Se detectó la expresión de CK-19, E-cadherina, o vimentina por tinción de inmunofluorescencia en células MCF7 transfectadas con vector control o vector que expresa ROR1 (63 aumentos). (E) Ensayos para migración celular (histogramas izquierdos) o invasión (histogramas derechos) en MDA-MB-231, HS-578T o BT549 transfectadas con ARNhc-CTRL (negro) o ARNhc-ROR1 (blanco). Todos los datos se normalizaron respecto a los resultados de células transfectadas con ARNhc-CTRL, que no se diferenciaban de los observados para las líneas celulares parentales. Los resultados son el valor medio para grupo de prueba (\pm EEM) ($n = 3$ por grupo de prueba). (F) Fotomicrografías representativas de MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CTRL (paneles izquierdos) o MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-ROR1 (paneles derechos) en ensayos para migración celular (arriba) o invasión (abajo). Los datos se muestran como medias \pm EEM; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, comparado con el grupo de ARNhc-CTRL.

La figura 3 muestra que el silenciamiento de ROR1 reduce la metástasis de cáncer de mama después de xenoinjertos de almohadillas mamarias. (A) Diagrama que representa la fase I o II del estudio. (B) Volúmenes tumorales a lo largo del tiempo (días) durante la fase I. (C) Peso de los tumores extirpados de cada grupo. (D) Flujo de fotones ex vivo de tumores primarios de cada grupo. (E-F) El flujo de fotones pulmonar in vivo (e) o flujo de fotones hepático (f) de cada ratón durante la fase II se normalizó con el flujo de fotones del tumor primario para cada ratón. Los histogramas representan el flujo de fotones pulmonar y hepático normalizado de cada grupo. (G) El flujo de fotones pulmonar in vivo durante la fase II de cada grupo. (H) Las barras horizontales indican flujo de fotones pulmonar ex vivo medio de ratones el d21 para cada grupo (izquierda). A la derecha están imágenes de bioluminiscencia representativas de los pulmones extirpados de cada grupo. (I) Los histogramas representan el índice de peso pulmonar para cada grupo. (J) Secciones de pulmón teñidas con H&E representativas. (K) Las barras horizontales indican flujo de fotones hepático ex vivo medio de ratones el d21 para cada grupo (izquierda). A la derecha están imágenes de bioluminiscencia representativas de los hígados extirpados de cada grupo. (L) Secciones teñidas con H&E representativas del hígado en d21 de ratones inyectados para cada grupo. Los datos se muestran como medias \pm EEM. Los datos se muestran

como medias \pm EEM; $P > 0,05$ se considera no significativo (N.S.), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparado con el grupo de ARNhc-CTRL.

5 La figura 4 muestra que el silenciamiento de ROR1 reduce la metástasis pulmonar experimental y metástasis en hueso de células MDA-MB-231 *in vivo*. A) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones inyectados i.v. con 5×10^5 células transfectadas con ARNhc-CTRL o transfectadas con ARNhc-ROR1 ($P < 0,001$ por la prueba del orden logarítmico). (B) El flujo de fotones pulmonar *in vivo* de cada grupo a lo largo del tiempo después de la inyección (izquierda). Se representan imágenes de bioluminiscencia representativas de ratones de cada grupo a la derecha. (C-E) Secciones teñidas con H&E representativas del pulmón en (c) d3, (d) d21, y (e) d28. (F) Los histogramas inferiores proporcionan flujo de fotones de GFP pulmonar *ex vivo* el d28. Imágenes representativas de los pulmones extirpados el d28. (G) El índice de peso pulmonar de cada grupo el d28 (abajo). Fotografías representativas de los pulmones (arriba) de cada grupo. (H) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones inyectados i.c. con 5×10^5 células transfectadas con ARNhc-CTRL o transfectadas con ARNhc-ROR1 ($P = 0,0017$ por la prueba del orden logarítmico). (I) Imágenes de bioluminiscencia representativas de ratones después de la inyección tumoral i.c. Las cajas blancas definen el área del que se adquirieron los datos de bioluminiscencia presentados en (j). (J) Los histogramas proporcionan el flujo de fotones en hueso *in vivo* normalizado de cada grupo. (K) El flujo de fotones en hueso *ex vivo* de los huesos pélvicos extraídos de cada grupo el d21. Se representan imágenes de bioluminiscencia representativas de los huesos pélvicos extraídos a la derecha. (L) Secciones histológicas de hueso teñidas con H&E de ratones de cada. La viñeta del ratón está modificada de la referencia (30). Los datos se muestran como medias \pm EEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparado con el grupo de ARNhc-CTRL.

La figura 5 muestra que un anticuerpo anti-ROR1 reduce la metástasis pulmonar de células MDA-MB-231 *in vivo*. (A) El Acm D10 produce internalización de ROR1. Se tiñeron células MDA-MB-231 con IgG control-Alexa647 (rojo), o D10-Alexa647 durante 30 min en hielo, y después o se mantuvieron en hielo (azul) o se transfirieron a 37°C durante 1 h (naranja) antes de la citometría de flujo. (B) Microscopía confocal de células MDA-MB-231 teñidas con D-10 (verde) antes y después de incubación de 1 h a 37°C . (C) Se trataron células MDA-MB-231 con o sin (-) IgG control (IgG) o D10 durante 24 h antes de la tinción con un anti-ROR1 sin bloqueo cruzado, marcado con fluorocromo, sin pérdida de viabilidad. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (IFM) de células tratadas (** $P < 0,001$ por ANOVA unidireccional). (D) Inmunotransferencias representativas probadas para vimentina (arriba), o β -actina (abajo) de lisados preparados de MDA-MB-231 antes (0h) o después de 1, 4 o 24 h de tratamiento con D10 o IgG control. Las proporciones de la intensidad de banda de vimentina respecto a β -actina se proporcionan debajo. (E) Se usaron inmunoprecipitados de lisado celular de MDA-MB-231 usando IgG control (IgG) o anti-ROR1 (ROR1) para análisis de inmunotransferencia ensayados con anticuerpos específicos para vimentina (arriba) o ROR1 (abajo). (F) Los histogramas proporcionan el número de células MDA-MB-231 migradas que se pretrataron durante 1 h con D10 o IgG control. (G) Izquierda, histogramas que representan el flujo de fotones pulmonar *in vivo*. Derecha, secciones teñidas con H&E representativas de los pulmones. (H) El gráfico representa el flujo de fotones pulmonar *in vivo* normalizado. (I) Imágenes de bioluminiscencia representativas de ratones inyectados con tumor tratados con IgG (arriba) o D10 (abajo). (J) El histograma representa el índice de peso pulmonar. (K) Secciones teñidas con H&E representativas de los pulmones. Los datos se muestran como medias \pm EEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparado con el grupo de IgG.

La figura 6 muestra las construcciones quiméricas usadas para mapear el epítipo del anticuerpo de ROR1 D10. La parte clara de la construcción es de ratón y la parte más oscura es humana.

45 La figura 7 representa el mapeo de epítipos del anticuerpo D10, que no reacciona con la proteína ROR1 de ratón. La proteína ROR1 de ratón o humana tienen residuos de aminoácidos diferentes en las posiciones 138, 142 o 160; la proteína ROR1 humana tiene los residuos de aminoácidos E, S o Y, en estas posiciones, mientras que la proteína ROR1 de ratón tiene los residuos de aminoácidos K, T o S en las posiciones de aminoácidos 138, 142 o 160, respectivamente. Se generaron proteínas ROR1 humanas recombinantes que tenían el residuo de aminoácido de ratón o humano en estas posiciones solo. Estas proteínas recombinantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturizante y después se transfirieron a nailon, que se ensayó con el Acm D10. Como se puede ver en esta figura, D10 reacciona con las proteínas recombinantes 1, 3, 4, y 7, pero no 2, 5 o 6, que se describen en la leyenda debajo. Nótese que la sustitución del residuo de aminoácido humano E en la posición 138 de la proteína ROR1 humana con el residuo de aminoácido de ratón T en la posición 138 anula la unión de D10.

55 La figura 8 representa el mapeo de epítipos del anticuerpo anti-ROR1 humano 4A5. La proteína ROR1 de ratón o humana tienen diferentes residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 88, 105, 109, o 111; la proteína ROR1 humana tiene los residuos de aminoácidos T, L, S, o I en estas posiciones, mientras que la proteína ROR1 de ratón tiene los residuos de aminoácidos S, I, A, o N en las posiciones de aminoácidos 88, 105, 109, o 111, respectivamente. Se generaron proteínas ROR1 humanas recombinantes que tenían o bien residuos de aminoácidos de ratón o humanos en estas posiciones solo. Estas proteínas recombinantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturizante y después se transfirieron a nailon, que se ensayó con el Acm 4A5. Como se puede ver en esta figura, 4A5 se pudo unir a las proteínas recombinantes 1, 2, 3, o 5, pero 4. La proteína recombinante 4 es la proteína ROR1 humana, pero con el residuo de aminoácido de ratón N en la posición 111 en lugar del residuo de aminoácidos I, que se encuentra en la proteína ROR1 humana.

La figura 9 demuestra que el anticuerpo anti-ROR1 humana D10 inhibe la metástasis de células de cáncer de mama. A-B. El anticuerpo monoclonal D10 facilita la internalización del receptor ROR1. C. 24 horas de tratamiento con anticuerpo anti-ROR1 D10 disminuye la expresión en superficie de ROR1 en células MDA-MB-231. D. ROR1 forma complejo con vimentina en células MDA-MB-231 de cáncer de mama. E. El tratamiento con el anticuerpo D10 in vitro pudo disminuir la expresión de vimentina. F. Los anticuerpos anti-ROR1 humana disminuyen la migración de cáncer de mama in vitro. G. El anticuerpo monoclonal D10 inhibe la metástasis pulmonar de estadio temprano (día 2) de cáncer de mama MDA-MB-231. H. El anticuerpo monoclonal D10 inhibe la metástasis pulmonar de cáncer de mama MDA-MB-231. I. Se muestran ratones representativos inyectados con 5E5 células MDA-MB-231 en la posición dorsal. J. El tratamiento con anticuerpo anti-ROR1 humana redujo el peso del pulmón de ratones portadores de MDA-MB-231. K. Histología H&E pulmonar representativa de ratones portadores de MDA-MB-231 después de tratamiento con anticuerpo anti-ROR1. Las barras de error indican el EEM; *p < 0,05, **p < 0,01; basado en una prueba de la t de Student bilateral de datos independientes.

La figura 10 representa anticuerpos de alta afinidad generados contra el epítipo de ROR1 reconocido por los Acm D10, 99451, 99961 o 99221. La proteína ROR1 de ratón o humana tienen diferentes residuos de aminoácidos en las posiciones 138, 142 o 160; la proteína ROR1 humana tiene los residuos de aminoácidos E, S o Y, en estas posiciones, mientras que la proteína ROR1 de ratón tiene los residuos de aminoácidos K, T o S en las posiciones de aminoácidos 138, 142 o 160, respectivamente. Se generaron proteínas ROR1 humanas recombinantes que tenían el residuo de aminoácidos de ratón o humano en estas posiciones solo. Estas proteínas recombinantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturizante y después se transfirieron a nailon, que se ensayó con cada uno de los tres Acm 99451, 99961 o 99221, como se indica en el margen izquierdo. Como se puede ver en esta figura, cada uno de estos anticuerpos reacciona con las proteínas recombinantes 2, 4, 5 y 8, pero no con 2, 3, 6 o 7, que se describen en la leyenda debajo. Nótese que la sustitución del residuo de aminoácido humano E en la posición 138 de la proteína ROR1 humana con el residuo de aminoácido de ratón T en la posición 138 anula la unión de cualquiera de 99451, 99961 o 99221.

La figura 11 representa la actividad de unión de los anticuerpos D10 o 99961 para la proteína ROR1 de tipo salvaje o recombinante. Se transfectaron vectores que codifican la proteína ROR1 humana o quimérica en células 293. Esto permitió la producción de proteína ROR1 quimérica humana-de ratón recombinante que después se pudo separar por tamaño en un gel de PAGE no desnaturizante (derecha) o gel de SDS-PAGE (izquierda) para análisis de inmunotransferencia con diferentes Acm anti-ROR1. Los resultados indican que los anticuerpos tanto D10 como 99961 se unen a la misma región, en el extremo C del dominio de tipo IgG, y que D10 y 99961 se pueden unir a todas las proteínas recombinantes excepto 13. La proteína quimérica #13 es como se describe en la figura 6. El dominio extracelular humano completo se proporciona en la línea más a la izquierda de cada gel.

La figura 12 muestra la caracterización del anticuerpo anti-ROR1 humana 99961. A, B. El anticuerpo 99961 fue capaz de bloquear el injerto de LLC en ratones transgénicos. C. El anticuerpo 99961 tiene una afinidad de unión aproximadamente 50x mayor que el anticuerpo D10.

La figura 13 muestra la actividad específica de 99961 contra células de LLC en sangre de cordón umbilical humano reconstituido en ratones inmunodeficientes. A. El anticuerpo 99961 elimina >90% de las células de LLC. B. C. El anticuerpo 99961 no tiene efecto en el desarrollo de células B o T normales.

La figura 14 muestra la actividad específica de 99961 en LMA primaria ROR+.

La figura 15 muestra que el epítipo reconocido por 99961 no es expresado por células madre o progenitoras hematopoyéticas normales.

La figura 16 muestra que 99961 no da reacción cruzada con tejido adulto normal.

La figura 17 muestra estudios PK sobre 99961 en ratones inmunodeficientes.

La figura 18 ilustra el diseño de una vacuna peptídica de ROR1. Se usaron tres epítopos de anticuerpo diferentes para hacer los péptidos A19, R22 y K19. Encima de las barras que corresponden a la ROR1 humana (arriba) o de ratón (abajo), hay barras marcadas A19, R22 o K19. Estas barras describen la localización de los péptidos A19, R22 o K19 en el dominio extracelular de ROR1.

La figura 19 muestra el método usado para conjugar KLH a los péptidos.

La figura 20 muestra el diseño peptídico del péptido R22. Se añadió una cisteína al extremo C del péptido que se va a usar para conjugar a KLH.

La figura 21 muestra que D10 y 99961 se unen al péptido R22 mientras que 4A5 no.

La figura 22 muestra el esquema de inmunización para la inmunización con R22 de ratones BALB/c.

La figura 23 muestra el análisis de inmunotransferencia del epítipo al que los anticuerpos de ROR1 inducidos por R22 se unen en ROR1.

La figura 24 muestra el esquema de inmunización para la inmunización con R22-KLH en ratones C57BL/6.

La figura 25 muestra el análisis de FACS de células de cáncer de mama MDA-MB-231 positivas para ROR1 que se habían incubado con antisueros anti-R22-KLH a 4°C o 37°C durante 1 h y después se contratiñeron con anticuerpo marcado con control isotipo-Alexa647, o conjugado 4A5-Alexa647 durante 30 min en hielo antes del análisis por FACS de la expresión de ROR1. Los resultados mostraron que los sueros anti-ROR1 de ratones transgénicos indujeron la internalización del receptor ROR1 a 37°C, pero no a 4°C.

La figura 26 muestra que sueros anti-ROR1 de ratones transgénicos inmunizados con R22-KLH inhiben la migración de cáncer de mama in vitro.

La figura 27 muestra el esquema de inmunización para la inmunización con R-22-KLH en ratones C57BL/6.

La figura 28 muestra las curvas de titulación de antisueros de ratones inmunizados con conjugados de KLH de cualquiera de los péptidos descritos en la figura 18. Se representa la unión de antisueros a placas de poliestireno recubiertos con proteína ROR1 humana evaluada a través de ELISA.

La figura 29 muestra el análisis de FACS de células EW36, JeKo-1 o LLC. Para este estudio, una dilución de antisueros de ratones inmunizados con R22-KLH se incubó con las células durante 20 minutos a 4 grados C. Las células se lavaron después y luego se marcaron con una Ig anti-ratón de cabra que se conjugó con un fluorocromo para la detección por citometría de flujo. Los histogramas abiertos son las células teñidas con la Ig anti-ratón de cabra sin incubar primero las células con el antisuero R22-KLH. Los histogramas sombreados son la fluorescencia de células que se incubaron primero con el antisuero R22-KLH. El aumento en la fluorescencia de las células se debe a los anticuerpos de ratón anti-ROR1 unidos a la superficie, que después se detectaron con la Ig anti-ratón de cabra. Los antisueros pre-inmunización de estos ratones o los antisueros de ratones inmunizados con KLH no se unieron a estas células.

Figura 30 – Las células indicadas en la leyenda se lavaron y sembraron en 25 µl con 5×10⁵ células por pocillo en RPMI/SBF al 10% en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Corning Costar). Se añadieron los antisueros diluidos (25 µl) y 25 µl de una dilución 1:5 de complemento de conejo recién nacido por pocillo. El Acm D10 se usó como un control positivo. Todas las condiciones se realizaron en triplicado. Las placas se incubaron durante 4 h a 37°C, y las células se cuantificaron inmediatamente para viabilidad por tinción con DiOC6/PI y análisis de citometría de flujo. Este estudio indica que o bien D10 o los antisueros generados contra el péptido R22-KLH pudieron dirigir la lisis mediada por complemento de células que portan ROR1 humana. Las células que no portaban ROR1 no se destruyeron (no mostrado).

La figura 31 muestra el primer esquema de inmunización de R22-KLH para ratones C57BL/6. Este péptido se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH) y después se usó para inmunizar ratones C57BL/6 según el esquema ilustrado arriba. La primera inyección de KLH o R22-KLH fue en adyuvante completo de Freund (CFA). La segunda y posteriores inyecciones fueron en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Los animales se sangraron los días marcados con la flecha púrpura. 44 días después del día de la primera inyección, los ratones C57BL/6 se expusieron a LLC que expresa ROR1 humana que se desarrolló en un ratón transgénico C57BL/6 con ROR1 humana que también era transgénico para la leucemia de células T 1 (gen TCL1), también bajo control de un promotor/potenciador específico de células B (E-Cµ). Esta leucemia se parece a LLC humana y expresa ROR1 humana de superficie.

La figura 32 muestra los resultados de la inmunización con R22-KLH. A. Un bazo representativo de ratones inmunizados con KLH frente a un ratón inmunizado con R22-KLH. B. Inhibición del injerto de LLC ROR1+ por inmunización con el péptido de ROR1 R22-KLH en ratones C57BL/6.

La figura 33 muestra el segundo esquema de inmunización para R22-KLH en ratones C57BL/6.

La figura 34 muestra los resultados de la inmunización con el péptido R22. A. Bazos de un ratón inmunizado con KLH y un ratón inmunizado con R22-KLH. B. Inhibición del injerto de LLC ROR1+ después de la inmunización con R22-KLH en ratones C57BL/6.

La figura 35 es análisis de FACS de esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados con KLH (fila superior) o R22-KLH (fila inferior), usando Acm conjugado con fluorocromo específico para B220 (eje y) o ROR1 (eje x). El Acm usado para teñir las células se une a un epítipo sin bloqueo cruzado de ROR1 más que los anticuerpos inducidos por R22-KLH. La caja delinea el área en el que se detectan las células de leucemia. Nótese que hay muchas menos, si hay alguna, células de leucemia en los bazos de ratones inmunizados con la vacuna de R22-KLH.

La figura 36 es un análisis de FACS de ROR1 en células de LLC ROR1+, que indica que ROR1 estaba modulada por disminución después de la inmunización con R22-KLH en ratones C57BL/6.

- 5 La figura 37 es un análisis de FACS de células T CD8+ presentes en ratones que se inmunizaron con KLH o R22-KLH. A. La inmunización con R22 produce un aumento en el número de células T CD8+, que estaba ausente en ratones inmunizados con KLH. El panel inferior muestra el porcentaje de células T CD8+ de los bazos de ratones inmunizados primero 75 días antes con KLH o R22-KLH.
- La figura 38 muestra el segundo esquema de inmunización para R22-KLH de ratones transgénicos ROR1.
- 10 La figura 39 es un análisis de FACS de la inhibición de injerto de LLC ROR1+ por inmunización con el péptido de ROR1 R22 en ratones ROR1-Tg.
- La figura 40 muestra los resultados de la inmunización con el péptido R22-KLH en ratones transgénicos ROR1. LLC ROR1+ se inhibió después de la inmunización con R22-KLH en ratones transgénicos ROR1.
- 15 La figura 41 es un análisis de FACS de ROR1 en células de LLC ROR1+, que indica que ROR1 estaba disminuida después de la inmunización con R22-KLH en ratones transgénicos ROR1.
- La figura 42 es un análisis de FACS de linfocitos T CD3+ presentes en ratones ROR1-Tg que se inmunizaron con KLH o R22-KLH. El panel A muestra que la inmunización con R22-KLH produjo una proliferación de linfocitos T. El panel B muestra el porcentaje de linfocitos T CD3+ recogidos de los bazos de ratones el día 75.
- 20 La figura 43 es un análisis de FACS de células T CD4+ presentes en ratones que se inmunizaron con KLH o R22-KLH. El panel A muestra que la inmunización con R22-KLH produce un aumento en el número de células T CD4+, que no se detectó en ratones inmunizados con KLH. El panel B muestra el porcentaje de células T CD4+ recogidas de los bazos de ratones el día 75.
- 25 La figura 44 es un análisis de FACS de células T CD8+ presentes en ratones que se inmunizaron con KLH o R22-KLH. El panel A muestra que la inmunización con R22-KLH produce un aumento en el número de células T CD8+, que no se detectó en ratones inmunizados con KLH. El panel B muestra el porcentaje de células T CD8+ recogidas de los bazos de ratones el día 75.
- 30 La figura 45 muestra que la expresión de alto nivel de ROR1 en cáncer de mama está asociada con supervivencia sin metástasis en pulmón, hueso y cerebro más corta. El gráfico se derivó de datos publicados disponibles a través de la base de datos PubMed GEO (GSE2603, GSE5327, GSE2034 y GSE12276). Las curvas de Kaplan-Meier representan el impacto pronóstico de la expresión de ROR1 en (A) la supervivencia sin metástasis en pulmón, (B) supervivencia sin metástasis en hueso, o (C) supervivencia sin metástasis en cerebro. Para cada análisis se segregaron 582 casos en terciles con el grupo designado ROR1H representando el tercio de los pacientes que tuvieron tumores con los niveles más altos del ARNm de ROR1, y el grupo designado ROR1L representando el tercio de pacientes que tuvieron cánceres con los niveles más bajos del ARNm de ROR1. El tercio de pacientes que tuvo tumores con expresión intermedia del ARNm de ROR1 se designó ROR1M. La supervivencia sin metástasis se determinó por análisis de Kaplan-Meier, y las diferencias estadísticas se determinaron por la prueba de orden logarítmico. El número de pacientes en cada categoría, los sucesos metastásicos totales, y los correspondientes valores de P (prueba chi cuadrado) se muestran en las tablas insertadas.
- 35 La figura 46 muestra que la expresión de alto nivel de ROR1 en cáncer de mama está asociada con supervivencia sin metástasis más corta, e independiente de su estado ER, PR y HER2. Se incluyó una cohorte de 582 pacientes con adenocarcinoma de mama en el análisis de supervivencia. (A) Comparación de los niveles de expresión del ARNm de ROR1 de las células malignas de pacientes de cáncer de mama ERNeg (n = 242) y ER+ (n = 325) (panel izquierdo), pacientes de cáncer de mama PRNeg (n = 274) y PR+ (n = 271) (panel central), y pacientes de cáncer de mama HER2Neg (n = 404) y HER2+ (n = 106) (panel derecho). Los resultados son medias ± EEM. El valor p se determinó mediante la prueba de la t de Student. (B) Impacto pronóstico del estado ER en supervivencia sin metástasis global (P = 0,13 por prueba del orden logarítmico). (C) Impacto pronóstico del estado ER y expresión del ARNm de ROR1 en supervivencia sin metástasis global (P < 0,0001 por la prueba del orden logarítmico). (D) Impacto pronóstico del estado PR en supervivencia sin metástasis global (P = 0,0007 por prueba del orden logarítmico). (E) Impacto pronóstico del estado PR y expresión del ARNm de ROR1 en supervivencia sin metástasis global (P < 0,0001 por la prueba del orden logarítmico). (F) Estado HER2 en supervivencia sin metástasis global (P = 0,16 por prueba del orden logarítmico). (G) Impacto pronóstico del estado HER2 y expresión del ARNm de ROR1 en supervivencia sin metástasis global (P < 0,0001 por la prueba del orden logarítmico).
- 45 La figura 47 muestra que la expresión de ROR1 por líneas celulares de cáncer de mama está asociada con características de TEM. (A) Inmunotransferencias de lisados de MDA-MB-321 transfectadas con ARNhc-CTRL o ARNhc-ROR1 se ensayaron con anticuerpos específicos para ROR1 (arriba) o β-actina (abajo) como se indica a la izquierda. (B) Cantidad media de VIM y KRT19 (±EEM), detectado a través de qRT-PCR en muestras en triplicado. Los datos se muestran como medias ± EEM; *P < 0,05, **P < 0,01, comparado con el grupo ARNhc-CTRL.
- 60
- 65

La figura 48 muestra que el silenciamiento de ROR1 reduce la expresión de CXCR4. (A) Histogramas que indican la cantidad de ARNm de CXCR4 detectado a través de qRT-PCR en muestras por triplicado de MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CRTL-2 o ARNhc-ROR1-2, como se indica en la parte inferior de cada histograma. (B) Histogramas de fluorescencia de citometría de flujo representativos de células MDA-MB-231 transducidas con ARNhc-ROR1-2 (histograma abierto con línea verde) o ARNhc-CRTL-2 (histograma abierto con línea azul) teñidas con Acm anti-CXCR4-APC o Acm de isotipo control (histogramas sombreados), respectivamente. (C) Se sembraron células en las cámaras superiores de transwell sin BD MatrigelTM para examinar la quimiotaxia hacia CXCL12, que se añadió a una concentración final de 200 ng/ml a las cámaras inferiores. Las células que migraron después de seis horas a 37°C se enumeraron a 10 aumentos. Los histogramas proporcionan cada uno los números de células que migraron en cada una de tres cámaras sembradas con células MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CRTL o ARNhc-ROR1, como se indica en el parte inferior del histograma. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Los datos se muestran como medias \pm EEM; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, comparado con el grupo ARNhc-CRTL.

La figura 49 muestra que el silenciamiento de ROR1 regula expresión de genes de TEM. Histogramas que indican la cantidad relativa de ARNm de una variedad de genes, como se indica en la parte inferior de cada histograma, detectados a través de qRT-PCR en muestras por triplicado de MDA-MB-231 (A), HS578T (B), y BT549 (C) transfectadas con ARNip-CRTL o ARNip-ROR1. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Los datos se muestran como medias \pm EEM; *P < 0,05, **P < 0,01, comparado con el grupo ARNip-CRTL.

La figura 50 muestra que el silenciamiento de ROR1 logra inhibición de crecimiento tardío modesta de xenoinjertos ortotópicos en el sitio de inyección, pero inhibición fuerte de metástasis pulmonares experimentales. (A) Se dio a ratones RAG- γ c-/- inyecciones subcutáneas (s.c.) o intravenosas (i.v.) de MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CRTL o transfectadas con ARNhc-ROR1. El flujo de fotones de bioluminiscencia del tumor primario en la almohadilla grasa mamaria inyectada o del pulmón de cada ratón se normalizó frente al flujo de fotones detectado para la primera medida después de la inyección del tumor (100 representa el 100% del flujo de fotones detectado el día de la medida inicial) (paneles superiores). Los tres gráficos superiores representan el flujo de fotones de bioluminiscencia normalizado de las almohadillas grasas mamarias de ratones a los que se dio inyecciones s.c. de 1×10^6 (izquierda), 5×10^5 (centro) o $2,5 \times 10^5$ (derecha) células indicadas. Los gráficos inferiores proporcionan el flujo de fotones de bioluminiscencia normalizado de los pulmones de ratones a los que se dio inyecciones i.v. de 1×10^6 (izquierda), 5×10^5 (centro) o $2,5 \times 10^5$ (derecha) células indicadas. (Nota: el gráfico izquierdo inferior representa el flujo de fotones de bioluminiscencia media real de los pulmones de ratones a los que se dio inyecciones s.c. de 1×10^6 células indicadas. (B) Los histogramas representan el índice de peso pulmonar de cada grupo el d21 (n=5-8) inyectado i.v. con MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CRTL (negro) o ARNhc-ROR1 (gris) o sin células (blanco). Los valores P se determinaron por ANOVA unidireccional. (C) Secciones teñidas por H&E del pulmón representativo de ratones de cada grupo el d21. Los datos se muestran como medias \pm EEM; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, comparado con el grupo ARNhc-CRTL.

La figura 51 muestra la inmunohistoquímica de focos metastásicos experimentales. Se dio a ratones RAG- γ c-/- inyecciones intravenosas (i.v.) de 5×10^5 MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CRTL (paneles superiores) o MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-ROR1 (paneles inferiores). (A) Se prepararon secciones de pulmón de animales sacrificados el día 21. Los pulmones de ratones inyectados con células transfectadas con ARNhc-ROR1 tenían menos focos metastásicos, que se identificaron por análisis inmunohistoquímico. Las secciones se tiñeron con Acm específicos para Ki67+, CK-19 o vimentina, o marcaje terminal de mella de dUTP desoxinucleotidil transferasa terminal (Tunnel). (40 aumentos). (B) Secciones de pulmón como en (a) se tiñeron con Acm específico para fosfo-AKT (panel izquierdo) o fosfo-CREB (panel derecho) (40 aumentos).

La figura 52 muestra que el silenciamiento de ROR1 reduce la metástasis pulmonar y metástasis a hueso de líneas celulares derivadas de MDA-MB-231 LM2-4175 y BoM-1833 in vivo. (A) Diagrama esquemático que muestra que las células LM2-4175 preferentemente metastatizan a pulmón y las células BoM-1833 preferentemente metastatizan a hueso. Análisis de citometría de flujo que muestran la expresión de ROR1 en LM2-4175 y BoM-1833. Las viñetas de ratón están modificadas de la referencia (Cancer Cell, 2009;1;67-78). (B-C) Análisis de citometría de flujo que muestran la eficacia de silenciar ROR1 en LM2-4175 y BoM-1833, usando ARNhc-ROR1-2. (D) A los ratones se le dio a cada uno una inyección i.v. de 2×10^5 células LM2-4175 transfectadas con ARNhc-CRTL o ARNhc-ROR1. Izquierda, imágenes de bioluminiscencia representativas de cada grupo; derecha, flujo de fotones de pulmón in vivo normalizado de cada grupo. (E) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones inyectados i.v. con 2×10^5 células LM2-4175 indicadas (P < 0,0001 por la prueba del orden logarítmico). (F) El índice de peso pulmonar de cada grupo el d21 (abajo). Fotos representativas de los pulmones de cada grupo (arriba). (G) El flujo de fotones de GFP de pulmón ex vivo de cada grupo en d21 (abajo). Fotos representativas de los huesos de cada grupo (arriba). (H) Secciones histológicas teñidas con H&E representativas del pulmón en d21. (I) Se dio a cada ratón una inyección i.c. de 1×10^5 células BoM-1833 transfectadas con ARNhc-CRTL o transfectadas con ARNhc-ROR1. Arriba, imágenes de bioluminiscencia representativas de cada grupo; abajo, flujo de fotones de hueso in vivo normalizado para cada grupo. (J) Flujo de fotones es vivo en hueso representativo y secciones histológicas teñidas con H&E del hueso en d21. (K) Flujo de fotones es vivo en hígado representativo y secciones histológicas teñidas con H&E del hígado en d21. Los datos se muestran como medias \pm EEM; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, comparado con el grupo ARNhc-CRTL.

La figura 53 muestra que el silenciamiento de ROR1 inhibe la migración de HS-578T y BT549 in vitro. Los datos se muestran como medias \pm EEM; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, comparado con células tratadas con IgG control.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere al descubrimiento fundamental de composiciones y métodos de inhibir metástasis usando anticuerpos anti-ROR1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, e inmunoconjugados de anticuerpo de ROR1.

10 Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Por tanto, por ejemplo, referencias “al método” incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento que serán aparentes para los expertos en la materia tras leer esta divulgación y demás.

15 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

20 ROR1

Los solicitantes han descubierto previamente la expresión de ROR1 de longitud completa en numerosas líneas celulares y muestras de cáncer, pero no en otros tejidos, incluyendo linfocitos de sangre o esplénicos de pacientes no leucémicos o donantes adultos normales, y también generaron antisueros de ratón contra ROR1 humana de longitud completa. Fukuda et al., Blood: ASH Annual Meeting Abstracts 2004 104, Abstract 772 (2004). El polipéptido y secuencias codificantes para ROR1 se han descrito en otro lugar (véanse, por ejemplo, los Nos. de acceso NP_005003.1 y NM_005012.1). Las células cancerosas que expresan la proteína Wtn5a, tal como células CLL, no solo se unen a ROR1, sino que también tienen una ventaja de supervivencia conferida como consecuencia. Por tanto, la invención proporciona medios para utilizar la especificidad de la expresión de ROR-1 en células cancerosas para tratar o prevenir cáncer.

Se ha mostrado que la expresión de ROR1 aumenta la resistencia a apoptosis y fomenta el crecimiento de células cancerosas. Como se muestra en los ejemplos, la expresión de ROR1 se asocia con la transición epitelial-mesenquimatoso (TEM), que se produce durante la embriogénesis y metástasis de cáncer. La expresión de alto nivel de ROR1 se asocia con tasas aumentadas de recaída y metástasis en pacientes con adenocarcinoma de mama. El silenciamiento de ROR1 en líneas celulares de cáncer de mama propensas a metástasis atenuó la expresión de proteínas asociadas con TEM (por ejemplo, vimentina, Snail-1/2 y ZEB), aumentó la expresión de citoqueratinas epiteliales y proteínas de las uniones estrechas (por ejemplo, CK-19 y ZO-1), y alteró su capacidad de migración/invasión y potencial metastásico. El tratamiento de MDA-MB-231 con D10, un Acm específico para ROR1, disminuyó la vimentina (que se asocia con ROR1) para inhibir la migración de células cancerosas. La administración de D10 a ratones inmunodeficientes injertados con MDA-MB-231 inhibe significativamente la metástasis tumoral.

Anticuerpos

45 Ciertos aspectos comprenden inmunopéptidos dirigidos contra la proteína ROR1 humana. Se muestra que los péptidos de inmunoglobulina, o anticuerpos, descritos en el presente documento se unen a la proteína ROR1. La actividad de unión a ROR1 es específica; la unión observada de anticuerpo a ROR1 no se bloquea sustancialmente por reactivos no específicos. Estos anticuerpos específicos de ROR1 se pueden usar para diferenciar entre células ROR1 y células normales. Los anticuerpos específicos de ROR1 también se pueden usar en inmunoterapia contra un cáncer ROR1, para determinar la respuesta después de la terapia para un cáncer ROR-1 y para inhibir metástasis. Tales inmunopéptidos se pueden generar en una variedad de medios conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término anticuerpo abarca todos los tipos de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, policlonales, monoclonales, y los producidos por la metodología de presentación en fagos. 55 Los anticuerpos particularmente preferidos de la invención son anticuerpos que tienen un grado relativamente alto de afinidad por ROR1. En ciertas formas de realización, los anticuerpos muestran una afinidad por ROR1 de aproximadamente $K_d < 10^{-8}$ M.

Sustancialmente purificado en general se refiere a una composición que está esencialmente libre de otros componentes celulares con los que los anticuerpos se asocian en un estado o medio no purificado, por ejemplo, nativo. El anticuerpo purificado en general está en un estado homogéneo, aunque puede estar o bien en un estado seco o en una solución acuosa. La pureza y homogeneidad típicamente se determinan usando técnicas de química analítica tal como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución.

65 El anticuerpo específico de ROR1 sustancialmente purificado habitualmente comprenderá más del 80% de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación antes de la mezcla o formulación del anticuerpo con un

5 soporte, excipiente, adyuvante, tampón, agente potenciador de absorción, estabilizante, conservante, adyuvante u otro coingrediente farmacéuticamente aceptable. Más típicamente, el anticuerpo se purifica para representar más del 90% de todas las proteínas presentes en una preparación purificada. En formas de realización específicas, el anticuerpo se purifica hasta más del 95% de pureza o puede ser esencialmente homogéneo en donde otras especies macromoleculares no son detectables por técnicas convencionales.

10 Los péptidos de inmunoglobulina incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de anticuerpos. Lo siguiente describe la generación de péptidos de inmunoglobulina, específicamente anticuerpos de ROR1, a través de métodos que pueden usar los expertos en la materia para hacer otros péptidos de inmunoglobulina adecuados que tienen afinidad y especificidad similares que son funcionalmente equivalentes a los usados en los ejemplos.

Anticuerpos policlonales

15 Los anticuerpos policlonales los puede generar fácilmente un experto en la materia a partir de una variedad de animales de sangre caliente tal como caballos, vacas, varias aves, conejos, ratones o ratas. Brevemente, el antígeno ROR1 se utiliza para inmunizar el animal mediante inyecciones intraperitoneales, intramusculares, intraoculares o subcutáneas, con un adyuvante tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund. Después de varias inmunizaciones de recuerdo, se recogen muestras de suero y se ensaya la reactividad hacia ROR1. Los antiseros policlonales particularmente preferidos darán una señal en uno de estos ensayos que es al menos tres veces mayor que el fondo. Una vez el título del animal ha alcanzado una meseta en términos de su reactividad hacia ROR1, se pueden obtener fácilmente cantidades mayores de antisuero ya sea por sangrados semanales, o desangrando el animal.

25 Anticuerpos monoclonales

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

30 Los clones seleccionados en HAT se inyectan en ratones para producir grandes cantidades de Acm en ascitis como se describe por Galfre, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.*, 73:3-46 (1981), que se pueden purificar usando cromatografía en columna de proteína A (BioRad, Hercules, Calif.). Los Acm se seleccionan en base a su (a) especificidad para ROR-1, (b) alta afinidad de unión, (c) isotipo, y (d) estabilidad.

35 Los Acm se pueden cribar o ensayar para especificidad por ROR1 usando cualquiera de una variedad de técnicas estándar, incluyendo inmunotransferencia (Koren, E. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 876:91-100 (1986)) y enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) (Koren, E. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 876:91-100 (1986)).

Anticuerpos humanizados

45 Se pueden generar formas humanizadas de anticuerpos de ratón uniendo las regiones CDR de anticuerpos no humanos a regiones constantes humanas por técnicas de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989 y documento WO 90/07861). Se pueden obtener anticuerpos humanos usando métodos de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Dower et al., documento WO 91/17271; McCafferty et al., documento WO 92/01047). En estos métodos, se producen genotecas de fagos en las que los miembros presentan diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos habitualmente se muestran como fragmentos Fv o Fab. Se pueden seleccionar fagos que presentan anticuerpos con una especificidad deseada por enriquecimiento de afinidad.

55 Fragmentos de anticuerpos

Puede ser deseable producir y usar fragmentos funcionales de un Acm para una aplicación particular. La estructura básica bien conocida de una molécula de IgG típica es una molécula en forma de Y tetramérica simétrica de aproximadamente 150.000 a 200.000 dalton que consiste en dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (que contienen aproximadamente 220 aminoácidos) y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (que contienen aproximadamente 440 aminoácidos). Las cadenas pesadas están unidas entre si mediante al menos un enlace disulfuro. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada contigua por un enlace disulfuro. Un sitio o dominio de unión a antígeno está localizado en cada brazo de la molécula de anticuerpo con forma de Y, y se forma entre las regiones amino terminales de cada par de cadenas ligera y pesada unidas por disulfuro. Estas regiones amino terminales de las cadenas ligera y pesada consisten en aproximadamente sus primeros 110 aminoácidos amino terminales y se conocen como las regiones variables de las cadenas ligera y pesada.

Además, en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada hay regiones hipervariables que contienen tramos de secuencias de aminoácidos, conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las CDR son responsables para la especificidad del anticuerpo para un sitio particular en una molécula de antígeno llamado epítipo. Por tanto, la molécula de IgG típica es divalente en que puede unir dos moléculas de antígeno porque cada sitio de unión a antígeno es capaz de unirse al epítipo específico de cada molécula de antígeno. Las regiones carboxi terminales de las cadenas ligera y pesada son similares o idénticas a las de otras moléculas de anticuerpo y se llaman regiones constantes. La secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas de un anticuerpo particular define una clase de anticuerpo es, por ejemplo, IgG, IgD, IgE, IgA o IgM. Algunas clases de anticuerpos contienen dos o más anticuerpos idénticos asociados entre sí en organizaciones de unión a antígeno multivalentes.

Se pueden usar fragmentos Fab y $F(ab')_2$ de Acm que se unen a ROR1 en lugar de los Acm enteros. Puesto que los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ son menores que las moléculas de anticuerpo intactas, están disponibles más dominios de unión a antígeno que cuando se usan moléculas de anticuerpo entero. Se sabe que el corte proteolítico de una molécula de IgG típica con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno separados llamados fragmentos Fab que contienen una cadena ligera intacta unida a un parte amino terminal de la cadena pesada contigua a través de un enlace disulfuro. La parte restante de la molécula de inmunoglobulina digerida con papaína se conoce como el fragmento Fc y consiste en las partes carboxi terminales del anticuerpo dejadas intactas y unidas a través de enlaces disulfuro. Si un anticuerpo se digiere con pepsina, se produce un fragmento conocido como $F(ab')_2$ que carece de la región Fc, pero contiene ambos dominios de unión a antígeno mantenidos juntos por enlaces disulfuro entre cadenas ligeras y pesadas contiguas (como los fragmentos Fab) y también enlaces disulfuro entre las partes restantes de las cadenas pesadas contiguas (Handbook of Experimental Immunology. Vol 1: Immunochemistry, Weir, D. M., Editor, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986)).

Se han desarrollado métodos de ADN recombinante que permiten la producción y selección de péptidos de inmunoglobulina recombinantes que son polipéptidos de unión a antígeno monocatenarios conocidos como fragmentos Fv monocatenarios (ScFv o anticuerpos ScFv). Además, los ScFv se pueden dimerizar para producir un diacuerpo. Los ScFv se unen a un epítipo específico de interés y se pueden producir usando cualquiera de una variedad de métodos recombinantes bacterianos basados en fagos, por ejemplo, como se describe en Lowman et al. (1991) Biochemistry, 30, 10832-10838; Clackson et al. (1991) Nature 352, 624-628; y Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-6382. Estos métodos habitualmente se basan en producir fagos filamentosos genéticamente alterados, tal como fagos M13 o fd recombinantes, que presentan en la superficie de la partícula del fago una proteína de fusión recombinante que contiene el anticuerpo SvFv de unión a antígeno como la región amino terminal de la proteína de fusión y la proteína de envuelta menor del fago g3p como la región carboxi terminal de la proteína de fusión. Tales fagos recombinantes se pueden hacer crecer fácilmente y aislar usando métodos de fagos bien conocidos. Además, las partículas de fago intactas habitualmente se pueden cribar directamente para la presencia (presentación) de un ScFv de unión a antígeno en su superficie sin la necesidad de aislar el ScFv de la partícula del fago.

Para producir un ScFv, se usan protocolos estándar de transcriptasa inversa para primero producir ADNc a partir de ARNm aislado de un hibridoma que produce un Acm para dirigirse al antígeno ROR1. Las moléculas de ADNc que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del Acm se pueden amplificar después por metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar usando un conjunto de cebadores para regiones variables pesada y ligera de inmunoglobulina de ratón (Clackson (1991) Nature, 352, 624-628). Los ADNc amplificados que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera del Acm se unen después con un oligonucleótido enlazador para generar una molécula de ADN de ScFv recombinante. El ADN de ScFv se liga en un plásmido de fago filamentosos diseñado para fusionar las secuencias de ADNc amplificadas en la región 5' del gen del fago que codifica la proteína de envuelta menor llamada g3p. Células bacterianas de *Escherichia coli* se transfectan después con los plásmidos de fagos recombinantes, y los fagos filamentosos crecen y se recogen. Los fagos recombinantes deseados presentan dominios de unión a antígeno fusionados a la región amino terminal de la proteína de envuelta menor. Tales "fagos de presentación" se pueden pasar después sobre antígeno inmovilizado, por ejemplo, usando el método conocido como "inmunoadsorción", véase Parmley y Smith (1989) Adv. Exp. Med. Biol. 251, 215-218; Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-6382, para adsorber esas partículas de fago que contienen proteínas de anticuerpo ScFv que son capaces de unirse al antígeno. Las partículas de fago de unión a antígeno se pueden después amplificar por métodos de infección de fagos estándar y la población de fagos recombinantes amplificada seleccionar de nuevo para capacidad de unión a antígeno. Tales rondas sucesivas de selección para capacidad de unión a antígeno, seguida por amplificación, seleccionan capacidad de unión a antígeno aumentada en los ScFv presentados en fagos recombinantes. La selección para afinidad de unión a antígeno incrementada se puede hacer ajustando las condiciones en las que la unión tiene lugar para requerir actividad de unión más estrecha.

Otro método para seleccionar actividad de unión a antígeno aumentada es alterar las secuencias de nucleótidos en el ADNc que codifica el dominio de unión del ScFv y someter poblaciones de fagos recombinantes a rondas sucesivas de selección para actividad de unión a antígeno y amplificación (véase Lowman et al. (1991) Biochemistry, 30, 10832-10838; y Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-6382).

Una vez se selecciona un ScFv, el anticuerpo de ROR1 recombinante se puede producir en una forma libre usando un vector apropiado junto con la cepa de *E. coli* HB2151. Estas bacterias realmente secretan ScFv en una forma

soluble, libre de componentes del fago (Hoogenboom et al. (1991) Nucl. Acids Res. 19, 4133-4137). La purificación de ScFv soluble del medio de cultivo de las bacterias HB2151 se puede lograr por cromatografía de afinidad usando moléculas de antígeno inmovilizadas en un soporte sólido tal como AFFIGEL™ (BioRad, Hercules, Calif.).

- 5 Otros desarrollos en la tecnología de anticuerpos recombinantes demuestran posibilidades para mejoras adicionales tal como aidez de unión aumentada por polimerización de ScFv en dímeros y tetrámeros (véase Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448).

10 Puesto que los ScFv son moléculas incluso más pequeñas que los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden usar para lograr densidades incluso mayores de sitios de unión a antígeno por unidad de área de superficie cuando se inmovilizan en un material soporte sólido que la posible usando anticuerpos enteros, fragmentos F(ab')₂, o Fab. Además, la tecnología de anticuerpos recombinantes ofrece una fuente genética de anticuerpos más estable, comparada con hibridomas. Los anticuerpos recombinantes también se pueden producir de forma más rápida y económica usando métodos de producción de fagos bacterianos estándar.

15 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos, variantes, o derivados de los mismos de la invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden o bien un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab. Las moléculas de ScFv se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente en EE UU No. 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Los ejemplos de scFv para ROR1 humana incluyen SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24.

20 Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una parte de las siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región bisagra, dominios CH1, CH2, y CH3. Los anticuerpos o fragmentos inmuno-específicos de los mismos de la presente invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o de pollo. En otra forma de realización, la región variable puede ser de origen condritoide (por ejemplo, de tiburones). Como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe posteriormente y, por ejemplo, en la patente en EE UU No. 5.939.598 por Kucherlapati et al.

Producción de anticuerpos recombinantes

40 Para producir los anticuerpos descritos en el presente documento de forma recombinante, ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de la cadena ligera y pesada, opcionalmente unidas a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligera y pesada se pueden clonar en el mismo o diferentes vectores de expresión. Por ejemplo, las cadenas pesada y ligera de SEQ ID NO: 1-5 se pueden usar según la presente invención. Las enseñanzas de la patente en EE UU No. 6.287.569 a Kipps et al. y los métodos proporcionados en el presente documento los pueden adaptar fácilmente los expertos en la materia para crear las vacunas de la presente divulgación. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de anticuerpo están operativamente unidos a secuencias de control en el vector(es) de expresión que aseguran la expresión de las cadenas de anticuerpo. Tales secuencias de control pueden incluir una secuencia señal, un promotor, un potenciador, y una secuencia de terminación de la transcripción.

50 Los vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huéspedes ya sea como episomas o como una parte integral del cromosoma huésped. E. coli es un huésped procariota particularmente útil para expresar anticuerpos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tal como Bacillus subtilis, y otras enterobacterias, tal como Salmonella, Serratia, y varias especies de Pseudomonas. En estos huéspedes procariotas, también se pueden hacer vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación) y secuencias reguladoras tal como un sistema de promotor de lactosa, un sistema de promotor de triptófano (trp), un sistema de promotor de beta-lactamasa, o un sistema de promotor del fago lambda. También se pueden usar otros microbios, tal como levadura, para la expresión. Saccharomyces es un huésped preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, tal como promotores, incluyendo 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, y un origen de replicación o secuencias de terminación según se desee. También se puede usar cultivo celular de tejido de mamífero para expresar y producir los anticuerpos de la presente invención (véase, por ejemplo, Winnacker, From Genes to Clones VCH Publishers, N.Y., 1987). Se prefieren células eucariotas, porque se han desarrollado un número de líneas celulares huéspedes adecuadas capaces de secretar anticuerpos intactos. Las células huéspedes adecuadas preferidas para expresar ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas de la invención incluyen: línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón

embrionario humano; células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino (CHO); células de Sertoli de ratón; células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL 1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL 151); y células TRI.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, la secuencias que codifican la cadena pesada y ligera y secuencias de control de la expresión) se pueden transferir a la célula huésped. La transfección con cloruro de calcio es comúnmente utilizada para célula procariotas, mientras que se pueden usar el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros huéspedes celulares (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989). Cuando las cadenas pesada y ligera están clonadas en vectores de expresión separados, los vectores se cotransfectan para obtener la expresión y ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Después de la introducción del ADN recombinante, líneas celulares que expresan productos de inmunoglobulinas se seleccionan por células. Las líneas celulares capaces de expresión estable son preferidas (es decir, niveles no disminuidos de expresión después de cincuenta pases de la línea celular).

Una vez expresados, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulinas de la presente invención, se pueden purificar según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel (véase, Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95% de homogeneidad, y lo más preferido del 98 al 99% o más de homogeneidad.

25 Anticuerpos multiespecíficos, inmunoconjugados de anticuerpos y moléculas de fusión

Los anticuerpos de ROR1 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden ser "multiespecíficos", por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad, lo que significa que reconoce y se une a dos o más epítopos diferentes presentes en uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo. Por tanto, si un anticuerpo de ROR1 es "monoespecífico" o "multiespecífico", por ejemplo, "biespecífico", se refiere al número de diferentes epítopos con los que reacciona un polipéptido de unión. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana descrito en el presente documento o pueden ser específicos para un polipéptido diana, así como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material soporte sólido.

Como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de potenciales dominios de unión, por ejemplo, dominios de unión a antígeno, presentes en un anticuerpo de ROR1, polipéptido de unión o anticuerpo. Cada dominio de unión se une específicamente a un epítipo. Cuando un anticuerpo de ROR1, polipéptido de unión o anticuerpo comprende más de un dominio de unión, cada dominio de unión se puede unir específicamente al mismo epítipo, para un anticuerpo con dos dominios de unión, llamado "monoespecífico bivalente", o a diferentes epítopos, para un anticuerpo con dos dominios de unión, llamado "biespecífico bivalente". Un anticuerpo también puede ser biespecífico y bivalente para cada especificidad (llamados "anticuerpos tetraivalentes biespecíficos"). En otra forma de realización, se pueden hacer anticuerpos tetraivalentes o anticuerpos con dominios delecionados.

Los anticuerpos bivalentes biespecíficos y los métodos de hacerlos, se describen, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; y las publicaciones de solicitud en EE UU. Nos. 2003/020734 y 2002/0155537. Los anticuerpos tetraivalentes biespecíficos, y los métodos de hacerlos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 02/096948 y WO 00/44788. Véase, en general, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60-69 (1991); patentes en EE UU Nos. 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992).

La presente invención incluye anticuerpos de ROR1 multiespecíficos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico compuesto de dos fragmentos de anticuerpo scFv, ambos de los cuales se unen a ROR1. Los fragmentos de anticuerpo scFv se pueden unir al mismo o diferentes epítopos en ROR1. Como un ejemplo adicional, el anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo que se une a los epítopos de los anticuerpos con una región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 17 y una región variable de la cadena ligera selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 19.

La invención se extiende además a proteínas de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión diana, y al menos una parte heteróloga, es decir, una parte con la que no está normalmente unida en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se unen en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína, pero están colocadas en una nueva organización en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión se pueden crear, por ejemplo, por síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada.

5 Los anticuerpos de ROR1, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención se pueden además fusionar de forma recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugar químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, anticuerpos específicos de ROR1 se pueden fusionar de forma recombinante o conjugar a moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tal como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente en EE UU No. 5.314.995; y documento EP 396.387. Los anticuerpos de ROR1 radiomarcados de la invención serán particularmente útiles, mientras que permanecen por desarrollar los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC).

10 Los anticuerpos de ROR1, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención incluyen derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no prevenga que el anticuerpo se una a ROR1. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueantes conocidos, corte proteolítico, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas incluyendo, pero no limitado a, corte químico específico, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

15 Los anticuerpos de ROR1, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención pueden estar compuestos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isósteros peptídicos, y pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los anticuerpos específicos de ROR1 se pueden modificar por procesos naturales, tal como procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones se pueden producir en cualquier lugar en el anticuerpo específico de ROR1, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremo amino o carboxilo, o en fracciones tal como hidratos de carbono. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o variable en varios sitios en un anticuerpo específico de ROR1 determinado.

20 La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo de ROR1, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo, y un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo al que el anticuerpo se fusiona puede ser útil para función o es útil para dirigirse a las células que expresan el polipéptido ROR1. En una forma de realización, una proteína de fusión de la invención comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de las regiones VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones VL de un anticuerpo de la invención, y una secuencia polipeptídica heteróloga.

25 En otra forma de realización, una proteína de fusión para uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las CDR de VH de SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 de un anticuerpo específico de ROR1, o fragmentos de la misma, y la secuencia de aminoácidos de las CDR de VL de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 de un anticuerpo específico de ROR1, o fragmentos de la misma, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En una forma de realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de un anticuerpo específico de ROR1 de la presente invención, o un fragmento de la misma, y una secuencia polipeptídica heteróloga, proteína de fusión que específicamente se une a al menos un epítipo de ROR1. También se divulga en el presente documento en el contexto de la invención que una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región VH de un anticuerpo específico de ROR1 de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos una región VL de un anticuerpo específico de ROR1 de la invención o fragmentos de las mismas, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, las regiones VH y VL de la proteína de fusión corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a al menos un epítipo de ROR1. En aún otra forma de realización, la proteína de fusión para uso en un método de diagnóstico y tratamiento divulgado en el presente documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las CDR de VH de un anticuerpo específico de ROR1 y la secuencia de aminoácidos de las CDR de VL de un anticuerpo específico para ROR1, o fragmentos de las mismas, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, la(s) CDR de VH o la(s) CDR de VL corresponde(n) a un único anticuerpo fuente (o fragmentos scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también están abarcadas por la invención.

30 Se pueden preparar proteínas de fusión usando métodos que se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 5.116.964 y 5.225.538). El sitio preciso en que se hace la fusión se puede seleccionar empíricamente para optimizar las características de secreción o unión de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión se transfecta después en una célula huésped para expresión.

También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-ROR1 humana; es decir, un anticuerpo anti-ROR1 aislado que tiene la misma especificidad de unión que el anticuerpo 99961. En un aspecto, el anticuerpo se une al dominio de tipo Ig que está contiguo con el dominio CRD de ROR1. En un aspecto adicional, el anticuerpo se une a los aminoácidos 42-160 de hROR1. En un aspecto más, el anticuerpo se une a los aminoácidos 130-160 de ROR-1. En otro aspecto, el anticuerpo requiere que esté presente ácido glutámico en la posición 138 de hROR1 para la unión.

La invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 aislado que comprende una región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, y SEQ ID NO: 17 y una región variable de la cadena ligera selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 19. En un aspecto, el anticuerpo según la región variable de la cadena pesada es SEQ ID NO: 5 y la región variable de la cadena ligera es SEQ ID NO: 7.

La invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 humana aislado que comprende una región variable de la cadena pesada compuesta de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, y la región variable de la cadena ligera compuesta de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32. La región variable de la cadena pesada compuesta de CDR1, CDR2 y CDR3 está compuesta de SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, y la región variable de la cadena ligera compuesta de CDR1, CDR2 y CDR3 está compuesta de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 humana con una afinidad de unión mayor de 41 nM. En un aspecto, la afinidad de unión del anticuerpo es entre aproximadamente 500 pM y aproximadamente 6 nM. En un aspecto, la afinidad de unión del anticuerpo es aproximadamente 800 pM.

En otro aspecto, el anticuerpo de la invención es para uso en un método de tratar metástasis. En un aspecto adicional, el anticuerpo se internaliza e inhibe la migración celular. En un aspecto adicional, el anticuerpo se internaliza y disminuye vimentina, snail1/2 o ZEB. En otro aspecto, el anticuerpo es humano, humanizado o quimérico. En un aspecto, el anticuerpo es 99961, 99961.1, 99961.2, 99961.3, o 99961.4. En un aspecto preferido el anticuerpo es 99961.1.

Una forma de realización de la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo contra ROR1 y un soporte farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización adicional, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo contra ROR1. En otra forma de realización, la invención proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención contra ROR1. En una forma de realización adicional, la invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención contra ROR1. También se divulga en el presente documento en el contexto de la invención un método de producir un anticuerpo anti-ROR1 de la invención que comprende cultivar las células huéspedes en condiciones para producir el anticuerpo. En un aspecto de la divulgación, el método comprende además recuperar el anticuerpo.

Como se muestra en los ejemplos, el anticuerpo anti-ROR1 D10 inhibe el injerto de LLC de ratón y humana, puede dirigir la citotoxicidad dependiente del complemento, induce una reducción significativa en la carga leucémica, y bloquea la metástasis de células de cáncer de mama al pulmón y hueso.

Se ha mostrado que D10 tiene actividad biológica mientras que otros anticuerpos anti-ROR1 conocidos (por ejemplo, 4A5, y K19) no muestran actividad biológica a pesar de que 4A5 tiene una afinidad de unión significativamente mayor para ROR1. Se ha mostrado que el anticuerpo 4A5 se une a diferentes epítomos que D10. También se ha mostrado que un subconjunto de pacientes de cáncer, en los que el cáncer es ROR+, se produce antisuero contra ROR1. Un subconjunto adicional de pacientes hace anticuerpos que inhiben la actividad Wtn5a, llevando por tanto a la conclusión de que no todos los anticuerpos de ROR1 tienen actividad biológica.

Como se describe además en los ejemplos, se realizó mapeo de epítomos para determinar el epítomo de D10 y 4A5. Estos estudios determinaron que D10 se une a un epítomo en el extremo C del dominio de tipo Ig que es contiguo a CRD en ROR1. El epítomo para 4A5 también se mapeó al dominio de tipo Ig, pero más cercano al amino terminal del dominio. Estos descubrimientos han llevado a la conclusión de que anticuerpos que se unen al mismo epítomo que D10 inhibirán la actividad biológica de ROR1 mientras que anticuerpos que se unen el otro lugar puede que no.

Como se muestra en los ejemplos, anticuerpos de alta afinidad, es decir, 99961, se derivaron usando el epítomo de D10 para seleccionar anticuerpos recombinantes de alta afinidad. Uno de los anticuerpos seleccionados, 99961, tiene una afinidad de unión significativamente mayor para ROR1 que D10. El anticuerpo 99961 tiene una afinidad de unión 50x mayor que D10, es decir, 800 pM frente a 41 nM. Además, 99961 se humanizó generando cuatro anticuerpos diferentes. Experimentos confirmaron que 99961 tiene el mismo epítomo que D10. Experimentos confirmaron que este epítomo no se expresa en células madre o progenitoras hematopoyéticas normales. Además, 99961 no da reacción cruzada con tejidos adultos normales. Este anticuerpo también demostró actividad contra células LLC, actividad en LMA primaria ROR+ e inducción de internalización de ROR1.

Vacunas

También se divulga en el presente documento una vacuna para el tratamiento o prevención de cáncer o la inhibición de metástasis en un sujeto que consiste en una composición farmacéuticamente aceptable de un péptido de unión a ROR1 aislado o sintéticamente producido. También se divulga en el presente documento un péptido de unión a ROR1 con al menos el 95% de identidad de secuencia a la región de unión a ROR-1 de D10. También se divulga en el presente documento un péptido de unión a ROR1 con al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a la región de unión de D10. En un aspecto de la divulgación, la región de unión de D10 es VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. En un aspecto adicional de la divulgación, la región de unión de D10 es EVVSSTGVLVFKFGPC. En un aspecto de la divulgación la región de unión de D10 tiene al menos 22 aminoácidos. En un aspecto adicional de la divulgación, la región de unión de D10 tiene al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 aminoácidos.

También se divulga en el presente documento un uso de vacunas de péptido de unión a ROR1 contra enfermedades, tal como un linfoma, por ejemplo, LLC, que implica la expresión de ROR1. Puesto que los tejidos adultos normales no parecen expresar ROR-1, representa un antígeno específico de tumor que puede ser objetivo en inmunoterapia activa. Por ejemplo, los niveles de ROR1 se pueden disminuir por administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna de péptido de unión a ROR1 que produce en animales una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra ROR1 y los efectos de su expresión. Las vacunas pueden incluir péptidos. Los métodos de usar tales péptidos incluyen el uso en vacunas y para generar anticuerpos contra ROR1. El péptido de unión a ROR1 también puede incluir un adyuvante inmunitario. El inmunoadyuvante puede ser una fracción soporte inmunógena conjugada al péptido de unión. En un aspecto, la fracción soporte inmunógena es un péptido. Los ejemplos de un soporte adecuado para la vacuna comprenden además un adyuvante inmunógeno. En un aspecto adicional de la divulgación, el adyuvante es una fracción soporte inmunógena conjugada al péptido de unión. La fracción soporte inmunógena puede ser un péptido soporte, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina, hidróxido de aluminio u otro adyuvante inmunitario farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar ejemplos de adyuvantes inmunitarios farmacéuticamente aceptables en *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 42: *Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols*; Editado por D. T. O'Hagan; Humana Press Inc., Totowa NJ y European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, *Guidelines on Adjuvants in Vaccines*, Londres 2004. Típicamente, la composición de vacuna también incluirá un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable.

También se divulga en el presente documento una vacuna contra células que expresan ROR-1, la vacuna comprende una composición farmacéuticamente aceptable de un péptido aislado o sintéticamente producido que tiene una secuencia de aminoácidos con el menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10. En un aspecto de la divulgación, la secuencia de aminoácidos de la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10 de la vacuna es VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. En un aspecto adicional de la divulgación, la secuencia de aminoácidos de la región de unión a ROR-1 del anticuerpo D10 de la vacuna es EVVSSTGVLVFKFGPC. En otro aspecto de la divulgación, la célula que expresa ROR1 es una célula cancerosa. En un aspecto adicional de la divulgación, la célula cancerosa es de una leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata, o suprarrenal.

También se divulga en el presente documento una vacuna que comprende un péptido de unión a ROR1 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC y un soporte farmacéuticamente aceptable. En un aspecto de la divulgación, el péptido es de mamífero. En un aspecto adicional de la divulgación, el péptido es quimérico y/o de origen humano, de ratón, rata, porcino, bocino, primate, felino, canino, de conejo, cabra, pollo o ursino. En otro aspecto de la divulgación, la vacuna comprende además un adyuvante inmunógeno. En un aspecto más de la divulgación, el adyuvante es un péptido soporte inmunógeno conjugado al péptido de unión. En un aspecto de la divulgación, la secuencia de aminoácidos del péptido de unión es VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. En otro aspecto de la divulgación, el péptido soporte inmunógeno es hemocianina de lapa californiana (KLH). La vacuna comprende además un adyuvante inmunógeno. En un aspecto adicional de la divulgación, el adyuvante es una fracción soporte inmunógena conjugada al péptido de unión. En un aspecto de la divulgación, la secuencia aminoácidos del péptido de unión es VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. La fracción soporte inmunógena puede ser un péptido soporte, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina, hidróxido de aluminio u otro adyuvante inmunitario farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar ejemplos de adyuvantes inmunitarios farmacéuticamente aceptables en *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 42: *Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols*; Editado por D. T. O'Hagan; Humana Press Inc., Totowa NJ y European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, *Guidelines on Adjuvants in Vaccines*, Londres 2004.

También se divulga en el presente documento una vacuna que comprende un péptido de unión a ROR1 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a EVVSSTGVLVFKFGPC y un soporte farmacéuticamente aceptable. En un aspecto de la divulgación, el péptido es de mamífero. En un aspecto adicional de la divulgación, el péptido es quimérico y/o de origen humano, de ratón, rata, porcino, bocino, primate, felino, canino, de conejo, cabra, pollo o ursino. En otro aspecto de la divulgación, la vacuna comprende además un

adyuvante inmunógeno. En un aspecto más de la divulgación, el adyuvante es un péptido soporte inmunógeno conjugado al péptido de unión. En un aspecto de la divulgación, la secuencia de aminoácidos del péptido de unión es EVVSSTGVLVFKFGPC. La fracción soporte inmunógena puede ser un péptido soporte, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina, hidróxido de aluminio u otro adyuvante inmunitario farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar ejemplos de adyuvantes inmunitarios farmacéuticamente aceptables en *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 42: Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols; Editado por D. T. O'Hagan; Humana Press Inc., Totowa NJ y European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, Guidelines on Adjuvants in Vaccines, Londres 2004.

También se divulga en el presente documento una formulación farmacéutica que comprende la vacuna que comprende un péptido de unión a ROR1 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC y un soporte farmacéuticamente aceptable.

También se divulga en el presente documento una formulación farmacéutica que comprende la vacuna que comprende un péptido de unión a ROR1 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a EVVSSTGVLVFKFGPC y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Como se muestra en los ejemplos, se desarrollaron vacunas de péptidos como se muestra en la figura 18. Se usaron tres péptidos basados en los epítomos de los anticuerpos de ROR1 D10, 4A5 y K19. Se inmunizaron animales con los tres péptidos. Todos los tres péptidos indujeron la producción de antisueros contra ROR1. Los resultados demuestran que la inmunización con el péptido R22 produjo el mayor título de anticuerpo. Como se indica en los ejemplos, los anticuerpos de ROR1 se unen a ROR1, disminuyen la carga leucémica, inducen la internalización de ROR1, median la citotoxicidad dependiente del complemento, inhiben la migración de células de cáncer de mama e inhiben el injerto de células de leucemia ROR+. Por tanto, en el presente documento se divulga un método para inmunizar pacientes contra ROR1 para permitir la inducción de anticuerpos para inhibir la capacidad de células cancerosas ROR+ para migrar y metastatizar.

Péptido de unión a ROR1

También se divulga en el presente documento un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID: 25 y SEQ ID NO: 26. En un aspecto de la divulgación, el péptido tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a VATNGKEVVSSTGVLVFKFGPC. En otro aspecto de la divulgación, el péptido tiene una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a EVVSSTGVLVFKFGPC. En otro aspecto de la divulgación, el péptido de unión es de mamífero. En un aspecto adicional de la divulgación, el péptido es quimérico y/o de origen humano, de ratón, rata, porcino, bocino, primate, felino, canino, de conejo, cabra, pollo o ursino.

También se divulga en el presente documento una formulación farmacéutica que comprende un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID: 25 y SEQ ID NO: 26 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

También se divulga en el presente documento un ácido nucleico aislado que codifica un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: 25 y SEQ ID NO: 26. También se divulga en el presente documento un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: 25 y SEQ ID NO: 26. También se divulga en el presente documento una célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: 25 y SEQ ID NO: 26. También se divulga en el presente documento un método de producir un péptido que comprende cultivar la célula huésped que codifica un péptido de unión a ROR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: 25 y SEQ ID NO: 26 en condiciones para producir el péptido de unión. En un aspecto, el método para producir el péptido comprende además recuperar el péptido de unión.

Supresión de metástasis

En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso como un medicamento en suprimir metástasis de cáncer que expresa ROR-1, el método comprende alterar la transición epitelial-mesenquimatosas de células tumorales administrando un anticuerpo de la invención. En un aspecto, el cáncer que expresa ROR-1 es leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata, o suprarrenal.

Los ejemplos proporcionan evidencia de que anticuerpos contra ROR1, péptidos de unión y vacunas tienen la capacidad para inhibir que células cancerosas ROR+ migren o metastaticen.

Tratamiento

65

Como se usa en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno, tal como el desarrollo o propagación de cáncer. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio de síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, no empeora), retraso o ralentización de la evolución de la enfermedad, mejora o alivio del estado de enfermedad, y remisión (sea parcial o total), sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia comparado con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Esos en necesidad de tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno, así como los propensos a tener la afección o trastorno o esos en los que la afección o trastorno se va a prevenir.

Como se usa en el presente documento, el término “cáncer” o “célula cancerosa” o “cáncer que expresa ROR1” o “célula cancerosa que expresa ROR1” se refieren a todos los crecimientos y proliferación celular neoplásicos, ya sean malignos o benignos, incluyendo todas las células y tejidos transformados y todas las células y tejidos cancerosos. Cáncer incluye, pero no está limitado a neoplasias, sean benignas o malignas, localizadas en: la próstata, colon, abdomen, hueso, mama, aparato digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenal, paratiroides, hipófisis, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, nervioso (central y periférico), sistema linfático, pélvico, piel, tejido blando, bazo, torácico y aparato urogenital. Tales neoplasias, en ciertas formas de realización, expresan, sobreexpresan o expresan anómalamente ROR1.

Cáncer también incluye, pero no está limitado a, leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata, o suprarrenal.

Los anticuerpos anti-ROR1 descritos en el presente documento se pueden usar en un método para el tratamiento o prevención de un cáncer ROR1 o para inhibir metástasis de una célula cancerosa ROR1 en un sujeto.

Anticuerpos

En ciertas formas de realización terapéuticas, el anticuerpo seleccionado será un anticuerpo anti-ROR1, que se puede administrar solo, o en combinación con, o conjugado a, uno o más agentes terapéuticos combinatorios. Cuando los anticuerpos descritos en el presente documento se administran solos como agentes terapéuticos, pueden ejercer un efecto beneficioso en el sujeto mediante una variedad de mecanismos. En ciertas formas de realización, anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hROR-1 se purifican y usan en un método de tratamiento que comprende administrar a un paciente para neutralizar una o más formas de hROR-1, para bloquear una o más actividades de hROR-1, o para bloquear o inhibir una interacción de una o más formas de hROR-1 con otra biomolécula.

Los reactivos inmunoterapéuticos de la invención pueden incluir anticuerpos humanizados, y se pueden combinar para uso terapéutico con ingredientes activos o inertes adicionales, por ejemplo, en soportes o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales, por ejemplo, adyuvantes inmunógenos, y opcionalmente con agentes activos complementarios o combinacionales tal como fármacos antineoplásicos.

En otras formas de realización, los anticuerpos terapéuticos descritos en el presente documento se administran coordinadamente con, coformulados con, o acoplados a (por ejemplo, unidos de forma covalente) un agente terapéutico combinacional, por ejemplo, un radionúclido, un inductor de diferenciación, un fármaco, o una toxina. Se pueden emplear varios radionúclidos conocidos, incluyendo ^{90}Y , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{211}At . Los fármacos útiles para uso en tales formulaciones y métodos de tratamiento combinacional incluyen metotrexato y análogos de pirimidina y purina. Los inductores de diferenciación adecuados incluyen ésteres de forbol y ácido butírico. Las toxinas adecuadas incluyen ricina, abrina, toxina de la difteria, toxina del cólera, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de *Shigella* y proteína antivírica de fitolaca. Estos agentes terapéuticos combinacionales se pueden acoplar a un anticuerpo anti-ROR1 ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un grupo enlazador). Una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro. Alternativamente, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico combinacional y un anticuerpo a través de un grupo enlazador como un espaciador para distanciar un anticuerpo del agente terapéutico combinacional para evitar interferencia con las capacidades de unión. Un grupo enlazador también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente o un anticuerpo, y así aumentar la eficacia de acoplamiento. Será evidente además para los expertos en la materia que se pueden emplear una variedad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo- como hetero-funcionales (tal como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) como grupo enlazador. Se puede llevar a cabo el acoplamiento, por ejemplo, mediante grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos glucídicos oxidados.

También puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo anti-ROR1. En una forma de realización, múltiples moléculas de un agente se acoplan a una molécula de anticuerpo. En otra forma de realización, más de un tipo de agente se puede acoplar a un anticuerpo. Independientemente de la forma de realización particular, se pueden

preparar inmunoconjugados con más de un agente en una variedad de maneras. Por ejemplo, más de un agente se puede acoplar directamente a una molécula de anticuerpo, o se pueden usar enlazadores que proporcionan múltiples sitios para la unión. Alternativamente, se puede usar un soporte.

5 Se pueden usar una variedad de rutas de administración para los anticuerpos e inmunoconjugados. Típicamente, la administración es intravenosa, intramuscular o subcutánea.

10 Será evidente que la dosis precisa del anticuerpo/inmunoconjugado variará dependiendo de tales factores como el anticuerpo usado, la densidad del antígeno, y la velocidad de depuración del anticuerpo. Una cantidad segura y eficaz de un agente anti-ROR1 es, por ejemplo, esa cantidad que produciría el efecto terapéutico deseado en un paciente al tiempo que minimiza los efectos secundarios indeseados. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz es esa suficiente para fomentar la producción de una o más citoquinas y/o producir citotoxicidad celular mediada por complemento o dependiente de anticuerpo. La pauta de dosis la determinarán médicos expertos, basada en factores tales como la naturaleza exacta de la afección que se trata, la gravedad de la afección, la edad y estado físico general del paciente, y demás.

15 En una forma de realización adicional, la invención proporciona el anticuerpo de la invención para uso en un método para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto. En un aspecto, el cáncer es leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata, o suprarrenal.

Inhibición de metástasis dirigiéndose a ROR1

20 La propagación de células neoplásicas desde su sitio original a áreas distantes del cuerpo es responsable del 90% de muertes relacionadas con cáncer. El proceso metastásico incluye la translocación física de células tumorales primarias a un órgano distante y la posterior colonización. Algunas firmas génicas de mal pronóstico sugieren que las células en algunos tumores primarios están predispuestas a la metástasis. Sin embargo, la comprensión de los determinantes moleculares y celulares de la metástasis es limitada, y los procesos por los que las células tumorales experimentan este suceso son en gran parte desconocidos. Se ha enfocado atención reciente en un programa celular biológico llamado la transición epitelial-mesenquimatosa (TEM), que se considera ahora prominentemente un factor en la evolución tumoral, adquisición de motilidad, invasividad, metástasis, y rasgos de autorrenovación.

25 La TEM confiere a las células epiteliales neoplásicas los rasgos biológicos necesarios para lograr la mayoría de las etapas de la cascada de invasión y metástasis. Tanto en desarrollo normal como en metástasis de cáncer, la TEM parece regulada por señales contextuales que reciben las células epiteliales de su microentorno. Mediante el uso de múltiples rutas implicadas en morfogénesis embrionaria y cicatrización, las células cancerosas pueden adquirir al mismo tiempo atributos que permiten invasión y metástasis.

30 El trabajo para definir células madre cancerosas (CMC) que pueden explicar la metástasis o recaída de cáncer después de terapia ha identificado una variedad de rasgos asociados con una o más subpoblaciones de CMC en varios tumores. Algunos de estos estudios han encontrado que la adquisición de características fenotípicas de células en TEM puede inducir que no CMC entren en un estado similar a CMC. Por tanto, las células cancerosas metastásicas, que presumiblemente han experimentado TEM, pueden mostrar un fenotipo CMC y adquirir propiedades invasivas que fomentan la supervivencia en la circulación, extravasación en un órgano distante, angiogénesis, y crecimiento incontrolado en los sitios metastásicos.

35 Como se detalla adicionalmente en los ejemplos, la expresión de alto nivel de ROR1 en células cancerosas se asocia con altas tasas de enfermedad recurrente y/o metastásica. Los efectos de la expresión y silenciamiento de ROR1 en pacientes con adenocarcinoma de la mama, descritos en el ejemplo 1, ilustra la práctica de la invención para inhibir metástasis. Como se muestra, silenciar la expresión de ROR1 en líneas celulares de cáncer de mama propensas a metástasis revierte las características fenotípicas asociadas con TEM y altera la migración, invasión y metástasis *in vitro* e *in vivo*. Además, los anticuerpos inventivos específicos para ROR1 inhiben metástasis de células de cáncer de mama humanas xenoinjertadas en ratones inmunodeficientes. Estos estudios identifican una ruta previamente desconocida para metástasis de cáncer de mama y validan ROR1 como una diana prometedor para el tratamiento del cáncer. Niveles de expresión bajos de ROR1 se correlacionaban con supervivencia sin metástasis más larga, y de forma más importante, el direccionamiento terapéutico de ROR1 con anticuerpos anti-ROR1 puede inhibir el desarrollo de metástasis de cáncer de mama.

40 La metástasis es la propagación de células cancerosas desde su localización primaria a otras partes del cuerpo. Una vez el cáncer se vuelve metastásico, no se puede tratar eficazmente mediante cirugía o terapia de radiación. Además, la causa predominante de la mortalidad de los pacientes es metástasis. Se sabe que los receptores tirosina quinasas (RTK) desempeñan papeles cruciales en muchos procesos celulares, incluyendo diferenciación, proliferación, migración, angiogénesis y supervivencia. Aunque se ha encontrado que ROR2 facilita la metástasis de células de melanoma y cáncer de próstata, no hay una diferencia significativa en la expresión de ROR2 entre líneas celulares de cáncer de mama agresivas y no agresivas. Sin embargo, la expresión de ROR1 tiene una fuerte correlación con las líneas celulares de cáncer de mama agresivas.

Mientras que la invención no está limitada por teorías respecto a su mecanismo de acción, es notable que ROR1 activa genes que codifican proteínas implicadas en metástasis de cáncer de mama, tal como Snail-1, Snail-2, TCF8/ZEB, CK-19, vimentina, CXCR4. Recientemente se ha descrito que AKT está implicada con funciones de metástasis, incluyendo TEM, resistencia a apoptosis y angiogénesis. Como se demuestra en los ejemplos, ROR1 aumentó la actividad de AKT y la exposición de células MDA-MB-231 al anticuerpo anti-ROR1 D10 redujo la actividad de p-AKT. Estos datos sugieren que la inhibición de la activación de AKT regulada por ROR1 puede ser un mecanismo por el que D10 ejerce su efecto antitumoral.

Con respecto a metástasis de cáncer de mama en particular, usando firmas de expresión génica se encontró que la expresión de ROR1 en tumores de mama primarios se asocia con metástasis de cáncer de mama incluyendo metástasis a hueso, pulmón y cerebro. Entre 582 casos que se analizaron, la tasa de recaída fue el 55% en el grupo de alta ROR1 comparado con el 37% en el grupo de ROR1 baja. De forma importante, esta tasa de recaída aumentó al 63% en el grupo de ROR1 del 75°-100°. La expresión de ROR1 también se correlaciona fuertemente con marcadores tumorales de cáncer de mama agresivo, incluyendo ER-, PR- y Her2-. Aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos basado en la fase T de cáncer de mama, el porcentaje de paciente con ROR1 alta aumento del 51% al 77% en las fases T1 y T4, respectivamente. La metástasis específica de órgano (cáncer de mama a pulmón o hueso) se inhibió significativamente atenuando ROR1 según la invención. Estos datos sugieren que ROR1 puede regular ciertos genes específicos de pulmón y hueso, tal como CXCR4.

Las quimioquinas humanas están comprendidas en una superfamilia de 48 ligandos que se unen a 19 receptores de quimioquinas acoplados a proteínas G diferentes. Se ha hipotetizado que las células tumorales metastásicas pueden 'secuestrar' rutas de migración celular mediadas por receptores de quimioquinas. Las células tumorales de cáncer de mama expresan receptores de quimioquinas seleccionados incluyendo CXCR4. La inhibición del eje CXCL12-CXCR4 según la invención puede bloquear la metástasis in vivo de la línea celular MDA-MB-231 al pulmón. Las células MDA-MB-23 silenciadas para ROR1 tuvieron menor expresión de CXCR4 que MDA-MB-231 parentales o MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CTRL.

Usando análisis de expresión génica, se encontró que la expresión de ROR1 también estaba asociada con metástasis a pulmón (Fig. 1B), hueso (Fig. 1C) y cerebro (Fig. 1D). Basado en un análisis de cociente de riesgos, se determinó que ROR1 era un predictor de metástasis global a hueso y pulmón incluso mejor que ER, PR y HER2. ROR1 también puede ser un gen predictor relacionado con metástasis basado en la tasa de recaída total de recaída total de pacientes de cáncer de mama por estado de ER y ROR1. Aunque hubo alguna diferencia entre casos ER+ y ER- en la fase temprana de la supervivencia sin metástasis, solo casos de ROR1 baja y ROR1 alta tuvieron diferencias significativas en las fases tardías de la supervivencia sin metástasis. Por tanto, la invención proporciona una ruta para inhibir la metástasis y mejorar la supervivencia del paciente.

En general, la dosis de anticuerpos de ROR1 administrados, componentes de anticuerpo de ROR1, composiciones de vacuna de péptido de unión, inmunoconjugados de los mismos y proteínas de fusión variará dependiendo de tales factores como la edad, peso, altura, sexo, estado médico general y antecedentes médicos previos del paciente. Típicamente, es deseable proporcionar al receptor una dosis de componente de anticuerpo, vacuna, inmunoconjugado o proteína de fusión que está en el intervalo desde aproximadamente 1 ng/kg a 20 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque también se pueden administrar una dosis menor o mayor según dicten las circunstancias.

La administración de anticuerpos, componentes de anticuerpo, vacunas, inmunoconjugados o proteínas de fusión a un paciente puede ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleurales, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional, o por inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas, péptidos o conjugados por inyección, la administración puede ser por infusión continua o por inyecciones emboladas únicas o múltiples.

Los expertos en la materia son conscientes de que la inyección intravenosa proporciona un modo útil de administración debido a la minuciosidad de la circulación en distribuir rápidamente anticuerpos. La administración intravenosa, sin embargo, está sometida a limitación por una barrera vascular que comprende células endoteliales de la vasculatura y la matriz subendotelial. Aún, la barrera vascular es un problema más notable para la absorción de anticuerpos terapéuticos por tumores sólidos. Los linfomas tienen velocidades de flujo de sangre relativamente altas, contribuyendo a la administración eficaz del anticuerpo. Las rutas intralinfáticas de administración, tal como inyección subcutánea o intramuscular, o por cateterización de vasos linfáticos, también proporciona un medio útil de tratar linfomas.

Preferiblemente, los anticuerpos de ROR1, inmunoconjugados de los mismos y proteínas de fusión se administran a bajas dosis de proteína, tal como de 20 a 3000 miligramos de proteína por dosis, dada una vez, o repetidamente, por vía parenteral. Alternativamente, la administración es en dosis de 100 a 300 miligramos de proteína por dosis, o de 300 a 1000 miligramos de proteína por dosis, de 1000 a 2000 miligramos de proteína por dosis.

La presente invención también contempla métodos terapéuticos en los que componentes de un anticuerpo de ROR1 se radiomarcen o suplementan con administración de inmunoconjugado o proteína de fusión radiomarcados. En una

variación, los anticuerpos de ROR1 se administran como o con anticuerpos de ROR1 radiomarcados de baja dosis o fragmentos. Como una alternativa, los anticuerpos de ROR1 se pueden administrar con inmunocombinados ROR1-citoquina radiomarcados de baja dosis. Los expertos en la materia serán familiares con moléculas de radiomarcado farmacéuticamente aceptables y sus niveles de dosis apropiados. Para referencia, considerar "bajas dosis" de inmunocombinados marcados con ¹³¹I, en donde una dosis preferible está en el intervalo de 15 a 40 mCi, mientras que el intervalo preferible es de 20 a 30 mCi. En contraste, una dosis preferida de inmunocombinados marcados con ⁹⁰Y está en el intervalo de 10 a 30 mCi, mientras que el intervalo más preferible es de 10 a 20 mCi.

La invención en todos sus aspectos se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los ejemplos no limitan, sin embargo, el ámbito de la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

ROR1 está asociada con recaída metastásica temprana en adenocarcinoma de mama

Se interrogaron los datos de transcriptoma en la base de datos GEO sobre células de cáncer de mama aisladas de pacientes en una cohorte combinada de 582 pacientes. Aproximadamente dos tercios (426 de 582) de estos casos no tenían cáncer detectable en los ganglios linfáticos regionales en el momento de la cirugía y no se les administró terapia adyuvante. Los casos restantes tenían enfermedad detectable en los ganglios linfáticos regionales y recibieron terapia hormonal adyuvante y/o quimioterapia. Entre los 582 casos, el 46% recayó (n=270), y tuvieron un tiempo de supervivencia sin metástasis mediana de 22,1 meses. Se segregaron los pacientes en tres grupos basado en su expresión relativa en células cancerosas de ROR1. Los pacientes con tumores que tenían el nivel del tercio superior de expresión del ARNm de ROR1 (ROR1_H) tuvieron una supervivencia sin metástasis significativamente más corta que pacientes con tumores que tenían el nivel del tercio inferior (ROR1_L) o nivel intermedio (ROR1_M) de expresión de ROR1 (p < 0,0001; Figura 1A). Se examinó la supervivencia sin metástasis por sitios de órganos. Se encontró que pacientes con tumores ROR1_H tenían mayores tasas de metástasis al pulmón (p = 0,002; Figura 45A), hueso (p = 0,004; Figura 45B), o cerebro (p = 0,04; Figura 45C) que pacientes con cánceres de mama ROR1_L o ROR1_M. Los cánceres ROR1_H tenían proporciones significativamente más bajas de tumores con características pronósticas favorables, tal como receptores de estrógeno/progesterona o HER2 que cánceres con ROR1_L o ROR1_M.

La expresión de alto nivel de ROR1 también funcionaba como un factor independiente en predecir supervivencia sin metástasis más corta. Los pacientes con tumores ROR1_H tenían una mayor tasa de metástasis, recaída más temprana, y peor supervivencia que pacientes con tumores ROR1_{L/M}, independientemente del estado de ER, PR, o HER2 (Figura 46). Además, la interrogación de los datos de las matrices GSE2034, GSE2603, GSE5327 y GSE12276 para firmas génicas de TEM en cáncer de mama reveló que los tumores ROR1_L tenían niveles de expresión significativamente más altos de genes asociados con células epiteliales, tal como CDH1 (que codifica E-cadherina), TJP1 (que codifica Zo1), y TJP3 (que codifica ZO3), pero niveles de expresión menores de genes asociados con células mesenquimatosas, tales como SNAI1 (que codifica Snail-1), SNAI2 (que codifica Snail-2), CDH2 (que codifica N-cadherina), o VIM (que codifica vimentina), que tumores ROR1_H (Figura 1B).

Ejemplo 2

Líneas celulares de cáncer de mama ROR1+

Se examinó la expresión de ROR1 de catorce líneas celulares epiteliales de cáncer de mama distintas, incluyendo seis líneas celulares de cáncer de mama de tipo basal y ocho líneas celulares de cáncer de mama de tipo luminal. El nivel de expresión de ROR1 era significativamente mayor en las líneas celulares de cáncer de mama de tipo basal relativo a las líneas celulares de cáncer de mama de tipo luminal, que en general no expresaban ROR1. Además, los niveles de expresión relativos de ROR1 se correlacionaban con fenotipos de tumor agresivo, tal como triple negativo ER^{Neg}PR^{Neg}HER2/Neu^{Neg}, y alto nivel de migración y capacidad de invasión *in vitro*.

Se silenció ROR1 en líneas celulares de cáncer de mama de tipo basal, muy invasivo (por ejemplo, MDA-MB-231) usando ARN horquillados cortos (ARNhc) que se dirigen a cualquiera de dos secuencias diferentes de ROR1. La expresión de la proteína ROR1 se inhibió en células transfectadas con ARNhc-ROR1-1 o ARNhc-ROR1-2, en contraste con células transfectadas con un ARNhc control (ARNhc-CTRL) (Figura 47A). La interrogación de los datos de matrices para diferencia de expresión génica entre MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CTRL o ARNhc-ROR1 (acceso GEO: GSE31631) reveló que las células silenciadas para ROR1 tenían mayores niveles de expresión de KRT19 (que codifica CK19), menores niveles de expresión de CXCR4 y VIM que MDA-MB-231 parentales o MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-CTRL. Estos descubrimientos se confirmaron por qRT-PCR (Figura 47B, Figura 48A). Los análisis de citometría de flujo también demostraron que la expresión en la superficie celular de CXCR4 era menor en células silenciadas para ROR1 (Figura 48B).

Para evaluar los potenciales papeles de ROR1 en la regulación de la TEM, se examinaron marcadores asociados a TEM en células tratadas con ARNhc-CTRL o ARNhc-ROR1. Suprimir la expresión de ROR1 con ARNip-ROR1 o ARNhc-ROR1-1/2 en cualquiera de tres líneas celulares de cáncer de mama de tipo basal distintas (MDA-MB-231, HS-578T, o BT549) atenuó su expresión del ARNm y/o proteínas codificadas asociadas con TEM (por ejemplo,

vimentina, SNAIL-1/2 y ZEB1). A la inversa, silenciar ROR1 aumentó la expresión del ARNm y citoqueratinas epiteliales codificadas (por ejemplo, CK-19). Aunque no hay cambios significativos en el ARNm de TJP1 que codifica ZO-1 en ninguna de las 3 líneas celulares examinadas, las células silenciadas para ROR1 tuvieron mayores niveles de expresión de esta proteína de uniones estrechas, lo que sugiere que ZO-1 podría estar bajo control postraduccional (Figura 1C-D y Figura 49). Por último, la transfección de células MCF7 ROR1-negativas para expresar ROR1 disminuyó la expresión de proteínas epiteliales (por ejemplo, E-cadherina y CK19), y aumentó la expresión de factores transcripcionales de TEM, tal como SNAIL1/2 (Figura 1E).

En cultivo, las células MDA-MB-231, HS-578T, o BT549 típicamente habían mostrado una morfología estrellada, que es similar a la de las células mesenquimatosas *in vitro*. Sin embargo, después de la transfección con ARNhc-ROR1 estas células asumieron una morfología más esférica, que era similar a la de las células epiteliales (Figura 2A). La transfección de estas células con ARNhc-CTRL no indujo tales cambios. Además, la tinción de inmunofluorescencia reveló que la transfección con ARNhc-ROR1 indujo a las células MDA-MB-231 a expresar niveles modestos de E-cadherina y mayores niveles de CK-19, pero expresión reducida de vimentina (Figura 2B). También se observaron resultados similares para células HS-578T, o BT549. Por otra parte, comparadas con células sin tratar o células transfectadas con un vector control, las células MCF7 ROR1-negativas desarrollaron una semejanza morfológica a células mesenquimatosas y tuvieron expresión disminuida de marcadores epiteliales (por ejemplo, CK19 y E-cadherina), y expresión aumentada de marcadores mesenquimatosos, tal como vimentina, cuando se transfectaron para expresar ROR1. Además, las células silenciadas para ROR1 tenían menos capacidad de migración/invasión comparada con la de las células tratadas con ARNhc-CTRL (Figura 2E y F). También se encontró que la quimiotaxis hacia CXCL12 estaba significativamente reducida en células silenciadas para ROR1 (Figura 48). Se obtuvieron resultados virtualmente idénticos usando células silenciadas con ARNhc-ROR1-1 o ARNhc-ROR1-2. En conjunto, estos resultados indican que la expresión de ROR1 puede contribuir a la TEM y metástasis tumoral.

Ejemplo 3

El silenciamiento de ROR1 inhibe la metástasis pulmonar ortotópica

Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, HS-578T, BT549, MDA-MB-415, MDA-MB-435s, MDA-MB-436, MDA-MB-157, MDA-MB-134, MCF7, BT-474, MDA-MB-453, SKBR3, MDA-MB-330, y BT-483 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se mantuvieron como se ha descrito previamente (Neve et al. *Cancer Cell*, 10:515 (2006)).

Atenuación de ROR1.

La atenuación de ROR1 se logró dirigiéndose a las secuencias 5'-TCC GGA TTG GAA TTC CCA TG-3' (ARNhc1), y 5'-CTT TAC TAG GAG ACG CCA ATA-3' (ARNhc2) como se ha descrito previamente (Zhang, S. Et al., *Cancer Cell*, 16:67 (2009)). Se creó un ARNhc no específico control dirigiéndose a la secuencia 5'-AGC GGA CTA AGT CCA TTG C-3'. Se usaron sistemas de expresión lentivíricos VirapowerTM (Invitrogen) para expresar el ARNhc según las instrucciones del fabricante. Las construcciones ARNhc-ROR1-1 y ARNhc-CTRL-1 también codificaban proteína fluorescente roja (RFP). Los oligonucleótidos para las construcciones ARNhc-ROR1-1 y ARNhc-CTRL-1 se sintetizaron (Integrated DNA Technologies) y se insertaron en el vector RFP-pLKO.1. Las construcciones ARNhc-ROR1-2 y ARNhc-CTRL-2 se compraron de Open Biosystems (Rockford, IL). Las partículas víricas para infección de líneas celulares de cáncer de mama se obtuvieron por transfección de la línea celular de empaquetamiento 293-FT, y se recogieron de sobrenadantes celulares a las 48 y 72 horas tras la transfección. Los sobrenadantes se filtraron y centrifugaron a 43.000 x g para concentrar las partículas víricas, que se usaron para infectar cultivos subconfluentes en presencia de polibreno 5 µg/ml durante la noche.

Veinticuatro horas tras la transfección, las células se seleccionaron con puromicina 2 µg/ml. Las células atenuadas se separaron por citometría de flujo usando un Acm anti-ROR1 (4A5). Las células separadas que expresan establemente ARNhc1 o ARNhc2 se designaron ARNhc-ROR1-1 o ARNhc-ROR1-2, respectivamente. Poblaciones agrupadas de células atenuadas, obtenidas en las primeras 10 generaciones después de la separación celular sin subclonación, se inyectaron en ratones rag-/-γ-/- para experimentos *in vivo*. La eficacia de la atenuación de ROR1 se confirmó por ensayos de expresión génica Sybr green de PCR cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) (Applied Biosystems), o análisis de inmunotransferencia (anticuerpo anti-ROR1, S4102, Cell Signaling). Se usaron β2-microglobulina y actina como controles endógenos para qRT-PCR e inmunotransferencia, respectivamente.

Ensayos de migración e invasión en Transwell

Las células cancerosas se acondicionaron durante la noche en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 0,2% sin factores de crecimiento. Al día siguiente, las células se tripsinizaron y resuspendieron en medio DMEM SBF al 0,2% sin factores de crecimiento. Las células tumorales se sembraron a una densidad de 25.000 células por pocillo en insertos transwell (tamaño de poro 3 µm, BD Falcon) para ensayos de migración o a una densidad de 50.000 células por pocillo en cámaras de invasión, con factores de crecimiento

reducidos, recubiertas con matrigel (tamaño de poro 8 μ M, BD Falcon). Los pocillos se lavaron con solución salina tamponada en fosfato (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4% después de 6 h para ensayos de migración o después de 22 h para ensayos de invasión. Las células en el lado apical de cada inserto se eliminaron por raspado. Las células que habían migrado al lado basal de la membrana se tiñeron y visualizaron con microscopio invertido Nikon.

Análisis de la expresión de ARNm y proteína

Se purificó ARN total usando el kit RNeasy (Qiagen) y se usaron 2 μ g de cada muestra para generar ADNc usando kits de transcripción de alta capacidad cDNA Reverser (ABI). Cada ADNc se analizó en triplicado usando un ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los niveles de expresión de proteína se evaluaron por análisis de inmunotransferencia con lisados celulares (40-60 μ g) en tampón de lisis (HEPES 20 mM (pH 7,9), glicerol al 25%, NaCl 0,5 N, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, ditiotreitól 0,5 mM, y desoxicolato al 0,1%) que contenía inhibidores de proteasas (Roche) usando anticuerpos anti-ROR1 (Cell Signaling) y anti- β -actina (Cell Signaling).

Citometría de flujo

Las células de cáncer de mama se tiñeron o separaron en conjuntos por citometría de flujo. Las células se lavaron y resuspendieron en seroalbúmina bovina (BSA) al 2% (Sigma) en solución de PBS y se tiñeron para expresión de ROR1 usando un anticuerpo conjugado a Alex488 (clon 4A5 o clon D10) o un control de isotipo IgG2b o IgG2a conjugado a Alex488 según el protocolo del fabricante. Los datos de citometría de flujo se recogieron usando un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) y se analizaron usando software FlowJob.

Análisis de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

Se fijaron pulmones de ratón con paraformaldehído al 4% y se embebieron en parafina o se congelaron en OCT para examen histopatológico. Se prepararon secciones de tejido (5 μ m de espesor) y se tiñeron con hematoxilina & eosina (H&E) o anticuerpos primarios hacia p-AKT (Ser473, D9E, Cell Signaling), p-Creb (Ser133, 87G3, Cell Signaling), CK-19 (RCK108, Dako), o vimentina (D21H3, Cell Signaling). Las imágenes se recogieron usando un microscopio Delta Vision y se procesaron con software SPOT.

Análisis de metástasis

Se inyectaron ratones Rag-/- γ -/- hembra con: un conjunto de células MDA-MB-231 ARNhc-ROR1-1-parentales (grupo 1), células ARNhc control para MDA-MB-231 parentales (grupo 2). Las células se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola lateral en 100 μ l de PBS (5×10^5 para los grupos 1-2; 2×10^5 para los grupos 3-4) o se administraron por inyección intracardiaca en 100 μ l de PBS (1×10^5 para los grupos 5-6). Se realizó imagenología de bioluminiscencia no invasiva semanalmente mediante sistemas de imagenología IVIS 200. Todos los ratones que no habían muerto previamente o parecían enfermos se sacrificaron a las 3-4 semanas tras la inyección, y se retiraron sus pulmones y fijaron en formalina al 10%.

Para estudiar el efecto de ROR1 en la metástasis in vivo de un xenoinjerto de almohadilla mamaria, se indujeron tumores de cáncer de mama en ratones Rag-/- γ -/- hembra de ocho semanas de edad inyectando 100 μ l de una suspensión de células individuales (1×10^6 células viables/ratón) por vía subcutánea en el área de la segunda almohadilla grasa de la glándula mamaria abdominal. El tamaño del tumor se midió cada 3 días. Los tumores se retiraron cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 300 mm³. Para estudiar el efecto terapéutico de anticuerpos monoclonales anti-ROR1 en metástasis de cáncer de mama, se indujeron tumores de mama en ratones Rag-/- γ -/- hembra de ocho semanas de edad mediante inyección intravenosa de 100 μ l de una suspensión de células individuales (5×10^5 células/ratón). Se inyectaron IgG de ratón o Acm anti-ROR1 por vía intravenosa semanalmente. Cinco semanas después del establecimiento del xenoinjerto, los ratones se sacrificaron y los pulmones se retiraron y fijaron en formalina al 10%.

Análisis de datos de expresión génica Oncomine

Se compiló un conjunto de datos de micromatrices de 582 pacientes de la base de datos GEO (GEO2603, GSE5327, GSE2034 y GSE12276). Estos conjuntos de datos se transformaron por log₂ y cada micromatriz se centró a la mediana de todas las sondas. Para cada paciente, se definió la supervivencia sin metástasis como el intervalo de tiempo entre la cirugía y el diagnóstico de metástasis. Los niveles relativos de la expresión del ARNm de ROR1 en tejidos humanos se determinaron por análisis de base de datos de Oncomine Cancer Microarray (www.oncomine.org) de un conjunto de datos de expresión génica publicado. Los datos se transformaron por log₂, con la mediana ajustada a cero y la d.e. ajustada a uno.

Análisis estadísticos. Se realizaron comparaciones entre curvas de Kaplan-Meier usando la prueba del orden logarítmico. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de la media (EEM). Se usó una prueba de la t de Student para datos independientes para comparar dos grupos a menos que se indique otra cosa. Un p<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Se analizó el rendimiento de ROR1 en predecir la supervivencia sin metástasis por análisis multivariable con modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Se describen el cociente de riesgos de cada covariable y su intervalo de confianza al 95%. Los valores P se calculan basados en la distribución normal, evaluando la probabilidad para que la hipótesis nula (cociente de riesgos = 1, es decir, sin significación pronóstica) sea cierta.

El potencial metastásico de células MDA-MB-231 transfectadas ARNhc-CTRL se comparó a transfectadas con ARNhc-ROR1 que se transfectaron establemente usando un vector de expresión luciferasa/GFP en un modelo ortotópico (Fig. 3A). La inyección de $2,5-10 \times 10^5$ células en la almohadilla grasa mamaria subcutánea de ratones RAG- γ -inmunodeficientes generó tumores primarios en el sitio de inyección que se pudieron seguir a través de luminiscencia. No se observaron diferencias significativas en los aumentos progresivos en bioluminiscencia de tumores que resultaron de células transfectadas con ARNhc-CTRL frente a transfectadas con ARNhc-ROR1 hasta 3 o más semanas después de la inyección de al menos 1×10^6 células, como se indica en estudios previos. Para examinar las diferencias en las tasas de metástasis de cáncer 'espontáneas', los tumores primarios resultantes de la inyección de 1×10^6 células se retiraron quirúrgicamente cuando alcanzaron un volumen de 300 mm^3 (línea de puntos, Figura 3B). Debido a las diferentes velocidades de crecimiento, la mediana del número de días desde la inyección de células a la eliminación quirúrgica de los tumores primarios era significativamente mayor para ratones inyectados con las células silenciadas para ROR1 ($40 \pm 2,5$ días) que para ratones que recibieron números iguales de células transfectadas con ARNhc-CTRL ($31 \pm 0,5$ días) (Figura 3B). Los tumores primarios extirpados tenían volumen, peso y bioluminiscencia ex vivo similares (Figura 3, C a E). Después de la eliminación del tumor primario se siguió la enfermedad metastásica mediante bioluminiscencia. Los animales inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL tenían significativamente mayor bioluminiscencia en el pulmón o hígado en el momento de extirpación del tumor primario que los ratones injertados con células silenciadas para ROR1 en tiempo posterior cuando se extirparon sus tumores primarios (Figura 3, E y F). Los animales inyectados con células silenciadas para ROR1 tenían aumento menos detectable en bioluminiscencia en el pulmón relativa a la de ratones inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL (Figura 3, H a J) e hígado (Figura 3, K y L). Los pulmones e hígados extirpados de ratones inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL tenían significativamente mayor bioluminiscencia y peso que los de ratones inyectados con células silenciadas para ROR1. Además, los pulmones e hígados de ratones inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL tenían universalmente enfermedad metastásica extensa, que no se observó en los tejidos de ratones inyectados con células silenciadas para ROR1 (Figura 3, J y L).

Ejemplo 4

El silenciamiento de ROR1 inhibe la metástasis a pulmón y hueso experimental

Se administraron células MDA-MB-231 transfectadas con ARNhc-ROR1 o ARNhc-CTRL a ratones Rag- γ - de 6 semanas de edad a través de inyección intravenosa (5×10^5 células) o intracardiaca (1×10^5 células) para evaluar diferencias en el potencial metastásico de células inyectadas en la sangre venosa o arterial. Todos los animales que recibieron células transfectadas con ARNhc-CTRL en la vena de la cola lateral murieron a los 32 días de la inyección debido a metástasis pulmonar. Los animales que tuvieron números iguales de células transfectadas con ARNhc-ROR1 inyectadas en la vena de la cola sobrevivieron significativamente más tiempo (Fig. 4A). Los animales inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL tuvieron 19 veces o 60 veces mayor bioluminiscencia en los pulmones el día 21 o el día 28, respectivamente, que los ratones inyectados con células silenciadas para ROR1 (Figura 4B). También se sacrificaron animales en otro experimento a varios tiempos para examinar los pulmones para enfermedad metastásica. Mientras que focos metastásicos nacientes se detectaron fácilmente a los 3 días después de la inyección de células transfectadas con ARNhc-CTRL, se pudieron detectar pocos, si alguno, focos metastásicos en los pulmones de animales inyectados con células silenciadas para ROR1, incluso a tiempos posteriores (Figura 4C-E). Además, los pulmones extirpados de ratones inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL tuvieron significativamente mayor bioluminiscencia ex vivo y mediana de peso (3 veces y 6 veces los días 21 y 28, respectivamente) que los pulmones de ratones inyectados con células silenciadas para ROR1 (Figura 4F-G, datos no mostrados). Los focos metastásicos que se desarrollaron en animales inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL también expresaron mayores niveles de fosfo-AKT y fosfo-BREB y tuvieron mayores proporciones de células en proliferación que los pocos focos metastásicos que se detectaron en ratones inyectados con células silenciadas para ROR1, que en su lugar expresaron mayores niveles de CK-19 y menores niveles de vimentina (Figura 47).

También se examinó la enfermedad metastásica después la inyección de 1×10^5 células en el ventrículo cardiaco izquierdo. Todos los ratones que recibieron células transfectadas con ARNhc-CTRL murieron a los 30 días de esta inyección, mientras que los animales inyectados con células silenciadas para ROR1 sobrevivieron significativamente más tiempo (Figura 4H). Los ratones inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL desarrollaron bioluminiscencia sustancial en el área femoral/pélvica, que no se detectó en ratones inyectados con células tumorales silenciadas para ROR1 (Figura 4 I y J). Se sacrificaron animales el día 21 y se encontró que los huesos femorales/pélvicos aislados de ratones inyectados con células transfectadas con ARNhc-CTRL tenían mayor bioluminiscencia (Figura 4K) debido a metástasis medular extensa (Figura 4L), que no era aparente en ratones inyectados con células silenciadas para ROR1.

Estudios recientes han encontrado que diferentes sitios en tejidos imponen diferentes requisitos para el establecimiento de metástasis por células cancerosas circulantes. Las líneas celulares de cáncer de mama humano BoM1833 y LM2-4175 se seleccionaron de MDA-MB-231 para tener diferente tropismo de tejido. BoM-1833 preferentemente metastatiza al hueso y LM2-4175 preferentemente metastatiza al pulmón. Se encontró que cada una de estas líneas celulares retenía expresión de ROR1 (Figura 5A). La transfección de cada línea celular con ARNhc-ROR1-2 silenció la expresión de ROR1 (Figura 5B y C), lo que permite examinar la dependencia de ROR1 de metástasis específica de órgano después de la inyección intravenosa de 2×10^5 LM2-4175 o la inyección intracardiaca de 1×10^5 BoM-1833 en ratones RAG- γ c- γ - de 6 semanas de edad. Los ratones inyectados con LM2-4175 silenciadas para ROR1 tenían una mediana de aumento significativamente menor en bioluminiscencia en pulmón y supervivencia mediana significativamente más larga que los ratones inyectados con LM2-4175 transfectadas con ARNhc-CTRL (Figura 5D y E). Consistente con estas observaciones, los pulmones de ratones aislados 21 días después de la inyección de LM2-4175 silenciadas para ROR1 tenían significativamente menor mediana de peso, bioluminiscencia ex vivo, y menos y más pequeños focos metastásicos que los ratones inyectados con LM2-4175 transfectadas con ARNhc-CTRL (Figura 5F a H). De forma similar, los ratones inyectados con BoM-1833 silenciadas para ROR1 tenían significativamente menores aumentos en bioluminiscencia esquelética que los ratones inyectados con números iguales de BoM-1833 transfectadas con ARNhc-CTRL (Figura 5I y J). Además, la necropsia de los animales sacrificados 21 días después de la inyección intracardiaca reveló pocos, si alguno, focos metastásicos detectables en el hueso o hígado. Esto estaba en marcado contraste con la enfermedad metastásica extensa detectada en cada uno de estos sitios en animales inyectados con BoM-1833 transfectadas con ARNhc-CTRL (Figura 5J y K).

Ejemplo 5

Un anticuerpo anti-ROR1 inhibe metástasis de cáncer

Se generaron anticuerpos monoclonales (Acm) específicos para el dominio extracelular de ROR1 y uno, designado D10, pudo inducir rápida disminución de ROR1 de superficie a 37°C (Fig. 5A). El tratamiento de MDA-MB-231 con D10 produjo la internalización de ROR1, evaluado a través de microscopía confocal (Figura 5B). Esto produjo reducción significativa de ROR1 de superficie, evaluado por citometría de flujo usando un Acm diferente específico para un epítipo distinto sin bloqueo cruzado de ROR1 (Figura 5C). El tratamiento de MDA-MB-231 con D10 también redujo la expresión de vimentina citoplásmica (Figura 5D), que se unía a ROR1 en estudios de coimmunoprecipitación (Figura 5E). El tratamiento con D10 también inhibió significativamente la migración y capacidad de invasión de MDA-MB-231 in vitro (Figura 5F y G). D10 también pudo inhibir la capacidad de migración/invasión de otras líneas celulares de cáncer ROR1+ (por ejemplo, HS-578T y BT549 (Figura 9)).

D10 se evaluó para inhibición de invasión y metástasis de MDA-MB-231 inyectadas en la vena de cola de ratones RAG- γ c- γ - . Después de la inyección de 5×10^5 células, a los ratones se les dio una inyección intravenosa de IgG control o D10 a 5 mg/kg y luego se sacrificaron 3 días después. La bioluminiscencia ex vivo de los pulmones de los animales a los que se dio D10 era significativamente menor que la de los animales tratados con IgG control (Figura 5H). Además, los pulmones de animales que recibieron IgG control tenían múltiples focos metastásicos, que no eran detectables en ratones tratados con D10. En otro experimento, cada ratón recibió una inyección intravenosa de 5×10^5 MDA-MB-231 y después se les dio 3 inyecciones intravenosas semanales de IgG control o D10 a 5 mg/kg. Los ratones tratados con D10 desarrollaron significativamente menos bioluminiscencia pulmonar que los ratones a los que se dio IgG control (Figura 5, I y J). Cuando se sacrificaron el día 35, los pulmones de los ratones tratados con D10 tenían peso significativamente menor (Figura 5K) y menos focos metastásicos (Figura 5L) que los pulmones de los animales a los que se dio IgG control. En conjunto, estos datos indican que D10 puede inhibir metástasis en ratones inmunodeficientes.

En conclusión, se demuestra en el presente documento que ROR1 puede mediar metástasis de cáncer de mama y que el tener como objetivo terapéutico a ROR1 puede retrasar el desarrollo de metástasis de cáncer de mama. Aunque las células madre embrionarias expresan proteína ROR1 detectable y la pérdida de ROR1 puede aumentar anomalías de corazón y esqueléticas en ratones deficientes en ROR-2, los principales tejidos adultos raramente expresan proteína ROR1, excepto a bajos niveles en el páncreas y tejido adiposo, proporcionando a los anticuerpos y métodos para su uso de la invención especificidad para cáncer ROR1.

Ejemplo 6

Anticuerpos de alta afinidad para ROR1

Se realizaron estudios de epítipos en el anticuerpo de ROR1 D10, descrito anteriormente. Se generaron una serie de proteínas quiméricas con tramos de ROR1 humana y de ratón para mapear el epítipo(s) reconocido(s) por D10 que podía disminuir ROR1, producir reducción en la expresión de vimentina, e inhibir la migración de células cancerosas in vitro (un buen marcador sustituto de la capacidad del cáncer para formar metástasis). La única región de ROR1 que está implicada es el dominio de tipo Ig que está en el extremo amino de ROR1. Cada construcción contiene un dominio de tipo Ig quimérico y dominio CRD y de Kringle humanos (la parte de ratón es clara, la parte humana es oscura). Solo los dominios de tipo Ig se muestran aquí (Figura 6). Estas construcciones se expresaron en células 293 free-style. El medio de cultivo se usó para inmunotransferencia y las proteínas purificadas se usaron para ELISA. Puesto que el

Acm D10 anti-ROR1 reconocía ROR1 humana, pero no ROR1 de ratón, encontrar cual de estas construcciones se podría o no unir podría ayudar a mapear el epítipo reconocido por D10. Los resultados indican que el anticuerpo D10 se une a ROR1 en el extremo C del dominio de tipo Ig contiguo al dominio CRD (Figura 7). La figura 8 muestra el mapeo del epítipo para el anticuerpo hacia ROR1 4A5. Como se ha indicado el epítipo de 4A5 se diferencia de epítipo de D10.

Como se ha descrito anteriormente, un anticuerpo anti-ROR1, es decir, D10, puede inhibir la metástasis pulmonar de células MDA-MB-231 in vivo. El anticuerpo monoclonal D10 facilita la internalización del receptor ROR1 (Figura 9 A, B). Las células MDA-MB-231 se tiñeron con iso-Alex647 o D10-Alex647 durante 30 minutos en hielo. Las células teñidas se separaron después en dos fracciones. Una fracción se mantuvo en hielo durante 1 h y las otras fracciones se transfirieron a 37°C durante 15 min, 30 min. El tratamiento con anticuerpo anti-ROR1 D10 de veinticuatro horas disminuye la expresión en superficie de ROR1 en células MDA-MB-231 (Figura 9C). ROR1 forma complejos con vimentina en células MDA-MB-231 de cáncer de mama (Figura 9D). El tratamiento con anticuerpo D10 in vitro pudo disminuir la expresión de vimentina (Figura 9E). Los anticuerpos anti-ROR1 disminuyen la migración de cáncer de mama in vitro (Figura 9F). El anticuerpo monoclonal D10 inhibe la metástasis pulmonar en fase temprana (2 días) de cáncer de mama MDA-MB-231 (Figura 9G). El anticuerpo monoclonal D10 inhibe la metástasis pulmonar de cáncer de mama MDA-MB-231 (Figura 9H). Ratones con xenoinjerto fueron inyectados por vía intravenosa (i.v.) con 200 mg de anticuerpo anti-ROR1 el día 1, y 100 mg de anticuerpo anti-ROR1 el día 3, 7, 14, y 21. Se muestran los flujos de fotones normalizados del pulmón de ratones que portan MDA-MB-231. Se muestran ratones representativos inyectados con 5E5 células MDA-MB-231 en la posición dorsal (Figura 9I). El tratamiento con anticuerpo anti-ROR1 redujo el peso del pulmón de ratones que portan MDA-MB-231 (Figura 9J). Histología H&E pulmonar representativa de ratones que portan MDA-MB-231 después de tratamiento con anticuerpo anti-ROR1 (Figura 9K). Las barras de error indican el EEM; *p < 0,05, ** p < 0,01, basado en una prueba de la t de Student bilateral para datos independientes.

Las construcciones representadas en la figura 6 se usaron para seleccionar anticuerpos recombinantes de alta afinidad. La inmunotransferencia nativa también indicó que los tres Acm humanizados similares a D10 se dirigen al mismo epítipo que D10 y requieren el aminoácido 138 para unión a ROR1 humana (Figura 10). Se transfectaron construcciones ROR1-ex humanas y quiméricas en células 293. Esto permitió la producción de proteínas ROR1 quiméricas humanas-de ratón recombinantes que se podrían separar por tamaño en un gel PAGE no desnaturizante o gel SDS-PAGE para análisis de inmunotransferencia con diferentes Acm anti-ROR1. Los resultados indican los anticuerpos tanto D10 como 99961 se unen a la misma región, en el extremo C del dominio de tipo Ig, y que D10 y 99961 se pueden unir a ROR1 tanto en condiciones desnaturizantes como nativas. El dominio extracelular humano entero se proporciona en el carril más a la izquierda de ambos geles (Figura 11). El anticuerpo 99961 tiene una afinidad de unión para ROR1 50x mayor que D10 y redujo la carga leucémica más que D10 (Figura 12). El anticuerpo 99961 se humanizó para producir cuatro anticuerpos designados 99961.1, 99961.2, 99961.3, y 99961.4.

Caracterización del anticuerpo contra ROR1 99961

Se realizaron ensayos para demostrar la actividad específica de 99961 contra células de LLC en sangre de cordón umbilical humano reconstituido en ratones inmunodeficientes. Ratones Rag-/-γ-/- reconstituidos con células de sangre de cordón umbilical (CB) humano de modo que desarrollaran un sistema inmunitario humano se inyectaron i.p. con CMSP de LLC recientes o congeladas. Al día siguiente a los ratones se les dio 1 mg/kg de 99961 o D10 o mIgG control i.v. Siete días después, las células CMSP de LLC de la cavidad peritoneal se recogieron y analizaron por citometría de flujo (Figura 13A). Los datos indican que 99961 elimina >90% de las células de LLC y no tiene efecto sobre el desarrollo de células B o T humanas normales (Figura 13B, C).

También se realizaron estudios para demostrar la actividad específica de 99961 en LMA primaria ROR+. Los resultados indican que 99961 disminuye la supervivencia de colonias primarias y las capacidades de autorrenovación de colonias secundarias (Figura 14).

El mapeo de epítipo del Acm 99961 demostró que este epítipo solo se expresa en varios cánceres y no en células de sangre de cordón umbilical o células adultas humanas y progenitores o células madre derivadas de hígado fetal (Figura 15). También se ha mostrado que 99961 se une a células leucémicas, pero no da reacción cruzada con tejidos adultos normales (Figura 16). La matriz multitejido de linfoma era de Lifescan Biosciences (LS-SLYCA5) con secciones de 40 linfomas, hubo 5 casos donde Ac999661 se unió a las células malignas. La matriz multitejido normal de Biomax (FDA999) con secciones de múltiples tejidos normales diferentes, no mostró áreas específicas de unión con 99961. La inmunohistoquímica se realizó usando recuperación de antígeno inducida por calor con tampón de alto pH de DAKO (Carpenteria, CA) seguido por aumento usando amplificación con biotilina tiramida (kit CSA de DAKO).

Se realizaron estudios PK de 99961 con 1 mg/ratón de anticuerpo inyectado iv a ratones Rag-/-γ-/- . Se extrajo sangre en diferentes puntos de tiempo y se midieron los niveles del Acm 99961 en plasma por ELISA. Los resultados indican que la semivida del anticuerpo era 11,4 días, el volumen era 1,18 ml (47 ml/kg) y la depuración era 0,072 ml/día (0,12 ml/h/kg) todo consistente con otras macromoléculas y anticuerpos clínicamente utilizados (Figura 17).

Ejemplo de referencia 7

Vacuna de péptido ROR1

5 Como se ha discutido anteriormente, se ha mostrado que D10 se une al extremo carboxi del dominio de tipo Ig que es contiguo al dominio CRD de ROR1. El anticuerpo 4A5 se une a un epítipo diferente en el dominio de tipo Ig y carece de actividad biológica. Los epítopos de los Acm se confirmaron por ROR-ex quiméricas y mutación dirigida de los aminoácidos diferentes entre ROR1 humana y de ratón. Se construyeron péptidos correspondientes al dominio extracelular de ROR1 donde se unen D10, 4A5 y otros anticuerpos de ROR1, A19, R22 y K19. El péptido A19
10 corresponde al epítipo reconocido por el Acm 4A5; el péptido R22 corresponde al epítipo reconocido por el Acm D10, el Acm 99961 (es decir, VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC), y los Acm 99961 humanizados; y el péptido K19 corresponde a una región en el dominio de Kringle que es reconocida por otros Acm específicos para ROR1 (Figura 18). Los tres péptidos se conjugaron cada uno en el extremo C con hemocianina de lapa californiana (KLH) para inmunización en adyuvante completo de Freund (CFA) o adyuvante incompleto de Freund (IFA). Se añadió una
15 cisteína (C) en el extremo C y se usó para conjugación a KLH con MBS (Figura 20). La reacción de conjugación se representa en la figura 19. Se mostró que los péptidos conjugados se unían a D10 y 99961 (Figura 21). Se inmunizaron ratones C57BL/6 y transgénicos con los péptidos conjugados. Se recogieron títulos de anticuerpos 4 semanas después de la inmunización. La vacuna R22-KLH indujo los títulos más altos de antisuero anti-ROR1 en ratones C57BL/6 o ratones ROR1-Tg (Figura 28). Este experimento se repitió con un péptido de 16 aminoácidos del epítipo de D10, R16 que también indujo anticuerpos que reaccionaban con la proteína ROR1 humana, aunque los títulos fueron en general
20 menores que los inducidos por R22-KLH (datos no mostrados).

Se mostró que los anticuerpos anti-ROR1 inducidos por la vacuna R22-KLH se unían a ROR1 de superficie presente en células EW36, JeKo-1, o de LLC (Figura 29). Para este estudio, una dilución de los antisueros de ratones
25 inmunizados con R22-KLH se incubó con las células durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavaron después y luego se marcaron con un anti-Ig de ratón de cabra que estaba conjugado con un fluorocromo para la detección por citometría de flujo. Los histogramas abiertos son las células teñidas con el anti-Ig de ratón de cabra sin incubarse primero las células con el antisuero de R22-KLH. Los histogramas sombreados son la fluorescencia de células que se incubaron primero con los antisueros de R22-KLH. El aumento en fluorescencia de las células es debido a los anticuerpos de ratón anti-ROR1 unidos a la superficie, que después se detectaron con anti-Ig de ratón de cabra. Los antisueros de preinmunización de estos ratones o los antisueros de ratones inmunizados con KLH no se unieron a estas células (Figura 29).
30

Los antisueros inducidos por R22-KLH se ensayaron para citotoxicidad dependiente del complemento. Células EW36, JeKO-1, LLC-1 y LLC-2 se lavaron y sembraron en 25 µl con 5×10^5 células por pocillo en RPMI/SBF al 10% en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Corning Costar). Se añadieron el antisuero diluido (25 µl) y 25 µl de una dilución 1:5 de complemento de conejo recién nacido por pocillo. Se usó Acm D10 como un control positivo. Todas las condiciones se realizaron en triplicado. Las placas se incubaron durante 4 h a 37°C, y las células se cuantificaron inmediatamente para viabilidad por tinción con DiOC6/PI y análisis de citometría de flujo. Este estudio indica que bien D10 o los
35 antisueros generados contra el péptido R22 pudieron dirigir la lisis mediada por complemento de células que portan ROR1 humana (Figura 30). Las células que no portaban ROR1 no fueron destruidas.

Las subclases de Ig de los anticuerpos inducidos por R22-KLH se examinaron. Para esto, se usó un ELISA usando placas recubiertas con ROR1 humana, que después se incubaron con antisuero diluido, se lavaron y después se detectaron usando anticuerpos secundarios conjugados a enzimas específicos para cada una de las subclases de IgG, como se indica en el eje x. Los resultados mostraron que IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 se inducían todas en grados variables. IgG2a, IgG2b e IgG3 están asociadas con el perfil Th1 e IgG1 está asociada con perfil Th2. Estos resultados indican que se activan células T auxiliares CD4+ Th1 y Th2 después de la vacunación.
45

Se usó R22-KLH para inmunizar ratones C57BL/6 como se muestra en la figura 31. La primera inyección de KLH o péptido R22-KLH fue en CFA. La segunda y posteriores inyecciones fueron en IFA. Los animales se sangraron en los días marcados con la flecha púrpura. Cuarenta y cuatro días después de la primera inyección, los ratones C57BL/6 se expusieron a células de LLC que expresan ROR1 humana que se originaron en un ratón transgénico de ROR1 humana. Este ratón era transgénico para la leucemia de células T 1 (gen TCL1). Ambos transgenes están bajo el control de un promotor/potenciador específico de células B (E-C μ). Esta leucemia se parece a la LLC humana y expresa ROR1 en superficie humana.
50
55

Los antisueros recogidos produjeron una reducción significativa en la carga de células de leucemia en ratones inmunizados con R22-KLH, pero no en ratones inmunizados con KLH (Figura 32).
60

Ratones C57BL/6

Se usó R22-KLH para inmunizar ratones C57BL/6 según el esquema de la figura 33. La primera inyección de KLH o péptido R22-KLH fue en CFA. La segunda y posteriores inyecciones fueron en IFA. Los animales se sangraron en los días marcados con la flecha púrpura. Cuarenta y cuatro días después de la primera inyección, los ratones C57BL/6 se expusieron a células de LLC que expresan ROR1 humana que se originaron en un ratón transgénico de ROR1 humana. Este ratón era transgénico para la leucemia de células T 1 (gen TCL1). Ambos transgenes están bajo el
65

control de un promotor/potenciador específico de células B (E-C μ). Esta leucemia se parece a la LLC humana y expresa ROR1 en superficie humana.

5 Respuesta de anticuerpos a ROR1 observada en ratones inmunizados con R22-KLH el día 42, pero no en ratones inmunizados con KLH. Todos los 4 ratones inmunizados con R22-KLH generaron anticuerpos de alto título contra ROR1 humana detectado a través de ELISA usando placas recubiertas con el dominio extracelular de proteína ROR1 humana recombinante. Estos indican que la inmunización con el péptido R22-KLH puede romper la autotolerancia a ROR1, que se expresa en todas las células B de estos ratones ROR1-Tg. Los bazos de los ratones a los que se dio el péptido R22-KLH permanecieron similares a los animales control, pero los ratones de KLH tuvieron bazos significativamente mayores (Figura 34).

15 Citometría de flujo de esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados con KLH o R22-KLH, usando Acm conjugado a fluorocromo específico para CD5 o ROR1. El Acm usado para teñir las células se une a un epítipo sin bloqueo cruzado de ROR1 que los anticuerpos inducidos por R22-KLH. Nótese que hay muchas menos, si alguna, células de leucemia en los bazos de ratones inmunizados con la vacuna R22-KLH (Figura 39).

20 El número total de células de leucemia encontradas en los bazos de ratones C57BL/6 inyectados con el péptido R22-KLH 30 días antes con 1×10^5 células de LLC ROR1+ humana era significativamente menor que los bazos de ratones inyectados con KLH. El número de células de leucemia por bazo se derivó multiplicando el porcentaje de células de leucemia en las poblaciones de esplenocitos (evaluado a través de citometría de flujo) por el número de esplenocitos recogidos del bazo (Figura 34).

25 El número de células CD8+ en los bazos de ratones inmunizados con KLH o R22-KLH se determinó por citometría de flujo. Después de la inmunización con R22-KLH hubo aumentos drásticos en células T CD8, que no aumentaron en ratones inmunizados con KLH. La fila inferior indica el número absoluto de células T CD8 recogidas de los bazos de los ratones el día 75 (Figura 37).

Ratones C57BL/6 transgénicos para ROR1

30 Se inyectaron ratones transgénicos con R22-KLH o KLH como se muestra en la figura 38. Los ratones son transgénicos para ROR1 humana bajo un promotor/potenciador específico de células B (E-C μ). La primera inyección de KLH o péptido R22-KLH fue en CFA. La segunda y posteriores inyecciones fueron en IFA. Los animales se sangraron en los días marcados con la flecha púrpura. Cuarenta y cuatro días después de la primera inyección, los ratones C57BL/6 se expusieron a células de LLC que expresan ROR1 humana que se originaron en un ratón ROR1-Tg que también era transgénico para la leucemia de células T 1 (gen TCL1). Ambos transgenes están bajo el control de un promotor/potenciador específico de células B (E-C μ). Por tanto, estos ratones ROR1-Tg tienen células B que expresan ROR1 humana. Los resultados demuestran que el péptido R22-KLH puede inducir inmunidad anti-ROR1 protectora en ratones que expresan ROR1 y por tanto romper la auto-tolerancia.

40 Se observó respuesta de anticuerpos a ROR1 humana en ratones ROR1-Tg inmunizados con R22-KLH el día 42, pero no en ratones inmunizados con KLH. Todos los 4 ratones inmunizados con R22-KLH generaron anticuerpos de alto título contra ROR1 humana detectado a través de ELISA usando placas recubiertas con el dominio extracelular de proteína ROR1 humana recombinante. Análisis adicionales por citometría de flujo demostraron que hay menos, si alguna, células de leucemia en los bazos de ratones inmunizados con la vacuna R22-KLH que en ratones inmunizados con KLH (Figura 40). El análisis de FACS también mostró que ROR1 estaba disminuida en los ratones inmunizados con R22-KLH, pero no en los ratones inmunizados con KLH. Los bazos de los ratones inmunizados con R22-KLH tuvieron significativamente menos células de leucemia comparados con ratones inmunizados con KLH. Como con los ratones C57BL/6, la inmunización con el péptido R22-KLH produjo aumentos drásticos en células T CD8, que no se incrementaron en ratones inmunizados con KLH (Figura 39). Se vieron resultados similares con células T CD4+ (Figura 43) y células T CD3+ (Figura 42).

Ratones BALB/c

55 Se inmunizaron ratones BALB/c con KLH o R22-KLH como se muestra en la figura 22. Para esto, KLH o el péptido conjugado a KLH se formó cada uno en una emulsión con adyuvante (CFA o IFA). CFA se usó para la primera inmunización e IFA se usó para el recuerdo posterior. Se indican los días de sangrado e inyección de péptido.

60 Los niveles de anticuerpo anti-ROR1 inducidos por R22-KLH se determinaron por ELISA. Con el dominio extracelular se ROR1 purificado se recubrió una placa de 96 pocillos y se incubó con antisueros con las veces de dilución indicados de días de sangrado individuales. Los resultados de ELISA indicaban que se inducían concentraciones de anticuerpos anti-ROR1 en ratones BALB/c inmunizados a lo largo del tiempo. Los sueros de estos animales recogidos antes de la inmunización no reaccionaron con la proteína ROR1, incluso a baja dilución de suero.

65 El análisis de inmunotransferencia también indicó que anticuerpos anti-ROR1 generados por inmunización con R22-KLH de ratones BALB/c produjeron anticuerpos anti-ROR1 que tenían la misma especificidad de epítipos que D10 (Figura 23). Además, parece que los antisueros también reaccionan con la proteína de ratón.

El análisis de FACS confirmó la unión de antisueros de ratones BALB/c inmunizados con R22-KLH a ROR1 en la superficie de células.

5 Ratones transgénicos II

Se inmunizaron ratones transgénicos con KLH o R22-KLH como se muestra en la figura 24. El péptido conjugado a KLH se mezcló con adyuvante (CFA o IFA). CFA se usó para la primera inmunización e IFA se usó para el recuerdo posterior. Los resultados de ELISA indicaban que se inducían concentraciones de anticuerpos anti-ROR1 en ratones transgénicos inmunizados a lo largo del tiempo. El análisis de FACS confirmó la unión de antisueros de ratones transgénicos inmunizados con R22-KLH a ROR1 en la superficie de células.

Se examinaron antisueros de ratones inmunizados con R22-KLH para capacidad de internalización del receptor ROR1. Se incubaron células MDA-MB-231 con antisueros de ratones transgénicos a 4°C o 37°C durante 1 h y después se tiñeron con isotipo-Alexa647 o 4A5Alexa647 durante 30 min en hielo antes del análisis por FACS de la expresión de ROR1. Los resultados mostraron que los sueros anti-ROR1 de ratones transgénicos inmunizados con R22-KLH indujeron internalización del receptor ROR1 (Figura 25).

Los antisueros de ratones inmunizados con R22-KLH se examinaron para determinar su efecto en migración de cáncer de mama. Las células que migraron se observaron a 10 aumentos después de 1 hora de tratamiento con antisuero y después 16 horas de incubación a 37°C. Los resultados son medias \pm e.e.m. n=3. **p < 0,01. Los resultados indicaban que los sueros anti-ROR1 de ratones transgénicos pudieron disminuir la migración de cáncer de mama in vitro (Figura 26).

25 **Lista de secuencias**

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Kipps, Thomas J.

Yu, Jian

30 Cui, Bing

Chen, Liguang

Widhopf, George

Prussak, Charles

35 <120> ANTICUERPOS Y VACUNAS PARA USO EN TRATAR CÁNCERES ROR1 E INHIBIR METÁSTASIS

<130> ST-UCSD3820-1WO

<150> US 61/709.803

40 <151> 04-10-2012

<150> US 61/693.230

<151> 24-08-2012

45 <160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

50 <211> 116

<212> PRT

<213> Ratón artificial

<220>

55 <223> Construcción sintética

<400> 1

ES 2 702 315 T3

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 2
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10 <400> 2
 gagatccagc tgcagcagtc tggacctgtc ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagggt 60
 tcttgcaagg cttctgggta tgcattcact gcctacaaca tacactgggt gagacagagc 120
 catggaaagc gccttgagtg gattggatct tttgatcctt acgatgggtg tagtagttac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa agccacattg actgtagaca aatcttccac cacagcctac 240
 atgcatctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aaggggggtg 300
 tactactttg actactgggg ccacgggacc actctcacag tctcctca 348

15 <210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

ES 2 702 315 T3

Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4
<211> 324
5 <212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 4
gacgtccaga taaccagtc tccatcttat cttgctgcat ctcttgaga aaccattact 60
attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatctag cctggtatca agagaaacct 120
gggaaaacta ataagctcct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg aattccatca 180
agattcaggg gcagtggatc tggtagacat ttcactotca ccatcagtag cctggagcct 240
gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag catgatgaat ccccgtagac gttcggagag 300
gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

10 <210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 5

ES 2 702 315 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
 65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 6
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggta tgcattcact gcctacaaca tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggttct tttgatcctt acgatggtgg tagtagttac 180
 aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 240
 cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagaggggtg 300
 tactactttg actactgggg ccacggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

15 <210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 7

ES 2 702 315 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 8
<211> 321
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Construcción sintética

<400> 8
gatattgtga tgaccagac tccaactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct 180
cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240
gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgatgaat ccccgtaac gttcggcgag 300
gggaccaagg tggaatcaa a 321

15 <210> 9
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 9

ES 2 702 315 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 10
<211> 348
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 10
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggta tgcattcact gcctacaaca tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggttct tttgatcctt acgatgggtg tagtagttac 180
aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 240
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagagggtgg 300
tactactttg actactgggg ccacggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

15 <210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 11

ES 2 702 315 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 12
 gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca gggcaagtaa gagcattagc aatatttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct 180
 cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240
 gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgatgaat ccccgtaac gttcggcgag 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 13
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 13

ES 2 702 315 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 14
<211> 348
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 14
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggta tgcattcact gcctacaaca tacactggat ccgccagccc 120
ccaggaaggg ggctggagtg gattggttct tttgatcctt acgatggtgg tagtagttac 180
aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 240
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagaggggtg 300
tactactttg actactgggg ccacggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

15 <210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 15

ES 2 702 315 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 16
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 16
 gatattgtga tgaccagac tccaactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctattct ggatccaact tgcaatctgg gatcccacct 180
 cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240
 gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgatgaat ccccgtaac gttcggcgag 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

15 <210> 17
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 17

ES 2 702 315 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
 65 70 75 80
 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 18
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcaactg tctctgggta tgcattcact gcctacaaca tacactggat ccgccagccc 120
 ccaggaagg ggctggagtg gattggttct tttgatcctt acgatgggtg tagtagttac 180
 aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 240
 cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagaggggtg 300
 tactactttg actactgggg ccacggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

15 <210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 19

ES 2 702 315 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 20
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 20
 gatggttgta tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctattct ggatccaactt tgcaatctgg gatcccacct 180
 cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240
 gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgatgaat ccccgtaac gttcggcgag 300
 gggaccaagg tggaatcaa a 321

15 <210> 21
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 21

ES 2 702 315 T3

Asp Ile Val Met Thr Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys
 20 25 30

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

Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
 130 135 140

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
 145 150 155 160

Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 165 170 175

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly
 180 185 190

Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys
 195 200 205

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro
 210 215 220

Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp
 225 230 235 240

Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 22
 <211> 753
 <212> ADN

5

ES 2 702 315 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 22

gatattgtga tgacccagac tccactctcc ctgcccgta ccctggaga gccggcctcc	60
atctcctgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct	180
cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct	240
gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgatgaat ccccgtaac gttcggcgag	300
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggtggt ggtagcggct ccacctctgg atccggcaag	360
cccggatctg gcgagggatc caccaagggc ggaggaggag gaagtcaggt gcagctgcag	420
gagtcgggcc caggactggt gaagccttca cagaccctgt cctcacctg cactgtctct	480
ggttatgcat tcaactgcta caacatacac tgggtgcgac aggccctgg acaagggctt	540
gagtgatggt gttcttttga tccttacgat ggtggtagta gttacaacca gaagttcaag	600
gacagactca ccatctcaa ggacacctcc aaaaaccagg tggtccttac aatgaccaac	660
atggaccctg tggacacagc cacgtattac tgtgcaagag ggtggtacta ctttgactac	720
tggggccacg gaaccctggt caccgtctcc tca	753

<210> 23

10

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Construcción sintética

<400> 23

ES 2 702 315 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 130 135 140
 Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly
 180 185 190
 Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
 195 200 205
 Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Thr Asp Pro Val
 210 215 220
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 225 230 235 240
 Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 24

ES 2 702 315 T3

<211> 753
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 24
 gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca gggcaagtaa gagcattagc aatatattag cctgggatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct 180
 cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240
 gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgatgaat ccccgtagac gttcggcgag 300
 gggaccaagg tggaaatcaa aggtggtggt ggtagcggct ccacctctgg atccggcaag 360
 cccggatctg gcgagggatc caccaagggc ggaggaggag gaagtcaggt gcagctgcag 420
 gagtccggcc caggactggt gaagccttca cagaccctgt ccctcacctg cactgtctct 480
 ggttatgcat tcaactgccta caacatacac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 540
 gagtggatgg gttcttttga tccttacgat ggtggtagta gttacaacca gaagttcaag 600
 gacagactca ccatctccaa ggacacctcc aaaaaccagg tggtccttac aatgaccaac 660
 atggaccctg tggacacagc cacgtattac tgtgcaagag ggtggtacta ctttgactac 720
 tggggccacg gaaccctggt caccgtctcc tca 753

10 <210> 25
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 25
 Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly Val Leu Phe
 1 5 10 15

Val Lys Phe Gly Pro Cys
 20

20 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

30 <400> 26
 Glu Val Val Ser Ser Thr Gly Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Cys
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Construcción sintética

 <400> 27
Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn
 1 5

 10 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Construcción sintética

 <400> 28
Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser
 1 5
 20 <210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Construcción sintética

 <400> 29
Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5
 30 <210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 <400> 30
Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 1 5

 <210> 31
 <211> 3
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética
 50 <400> 31
Ser Gly Ser
 1

 <210> 32
 55 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Construcción sintética

ES 2 702 315 T3

<400> 32
Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
 1 5

5 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 33
Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln
 1 5 10 15

15 <210> 34
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 34
Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15

25 **Lys Asp**

<210> 35
 <211> 23
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

35 <400> 35
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly
 1 5 10 15

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 20

<210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

45 <400> 36
Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr
 1 5 10

50 <210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <400> 37

Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly
1 5 10

<210> 38

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 38

Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys
1 5 10 15

Val Glu Ile Lys
20

<210> 39

20 <211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

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

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Leu Leu
65 70 75 80

Lys Met Thr Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Gly Ser Ser Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

25

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 351

<212> ADN

30 <213> Mus musculus

ES 2 702 315 T3

<400> 40
 caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagac tctgtccatc 60
 acttgcactg tctctggggt ttcattaacc agttatgggtg tacactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatgggctg gtggattcac aaattataat 180
 tcggctctca agtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttctctta 240
 aaaatgacca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag gagaggtagt 300
 tcctattcta tggactattg gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc a 351

5 <210> 41
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 41
 Glu Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Asn Val Ser Tyr Ile
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Thr Ser Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
 100 105

15 <210> 42
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 42
 gaaattgtgc tctctcagtc tccagccatc acagctgcat ctctgggcca aaaggtcacc 60
 atcacctgca gtgccagttc aaatgtaagt tacatccact ggtaccagca gaggtcaggc 120
 acctccccca gaccatggat ttatgaaata tccaaactgg cttctggagt cccagttcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240
 gatgctgcca tttattattg tcagcagtggt aattatcctc ttatcacggt cggctcgggg 300
 20 acaaagttgg aaatacaa 318

ES 2 702 315 T3

<210> 43
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 43
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly
 85 90 95
 Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 44
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 44
 gaagtgaaac tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcttgggt tcgccagatt 120
 ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtcgtg gtggtaccac ctactatcca 180
 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacat cctgtacctg 240
 caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtggaag atatgattac 300
 gacgggtact atgcaatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357

20 <210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 45

ES 2 702 315 T3

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Pro Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gly Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105

5 <210> 46
 <211> 322
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 46
 gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtcc ggacattaat agctatttaa gctggttcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggttgatgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcggtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcaacag cctggagtat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgaat ttccgtacac gttcggaggg 300
 10 gggaccaagc tggaaatgaa ac 322

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un anticuerpo anti-ROR1 humana aislado que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera,
- 10
- en donde dicha región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 como se muestra en SEQ ID NO: 27, una CDR2 como se muestra en SEQ ID NO: 28, una CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 29; y en donde dicha región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 como se muestra en SEQ ID NO: 30, una CDR2 como se muestra en SEQ ID NO: 31, y una CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 32.
- 15
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a los aminoácidos 130-160 del polipéptido maduro de hROR-1.
3. El anticuerpo según la reivindicación 2, en donde el anticuerpo requiere que el aminoácido 138 de ROR1 del polipéptido maduro sea ácido glutámico para su unión a hROR-1.
- 20
4. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde
- (a) el anticuerpo inhibe metástasis; y/o
- (b) el anticuerpo es humanizado o quimérico.
- 25
5. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso como un medicamento para suprimir la metástasis de cáncer que expresa ROR-1, el uso comprende alterar la transición epitelial-mesenquimatosa de células tumorales administrando el anticuerpo.
- 30
7. El anticuerpo para uso según la reivindicación 6, en donde el cáncer que expresa ROR-1 se selecciona del grupo que consiste en: leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata y suprarrenal.
8. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en tratar o prevenir un cáncer en un sujeto, el uso comprende administrar al sujeto el anticuerpo.
- 35
9. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 8, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: leucemia de células B, linfoma, LLC, LMA, B-LLA, T-LLA, cáncer ovárico, de colon, pulmón, piel, pancreático, testicular, de vejiga, uterino, de próstata y suprarrenal.

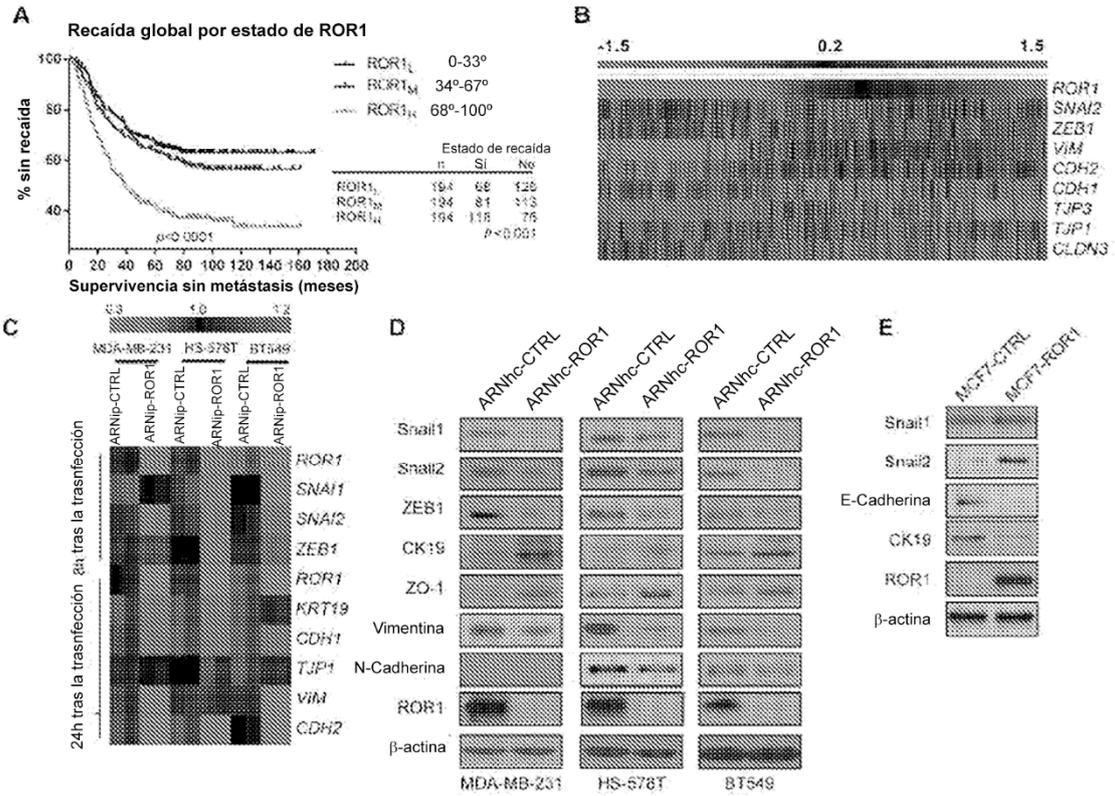


FIG. 1

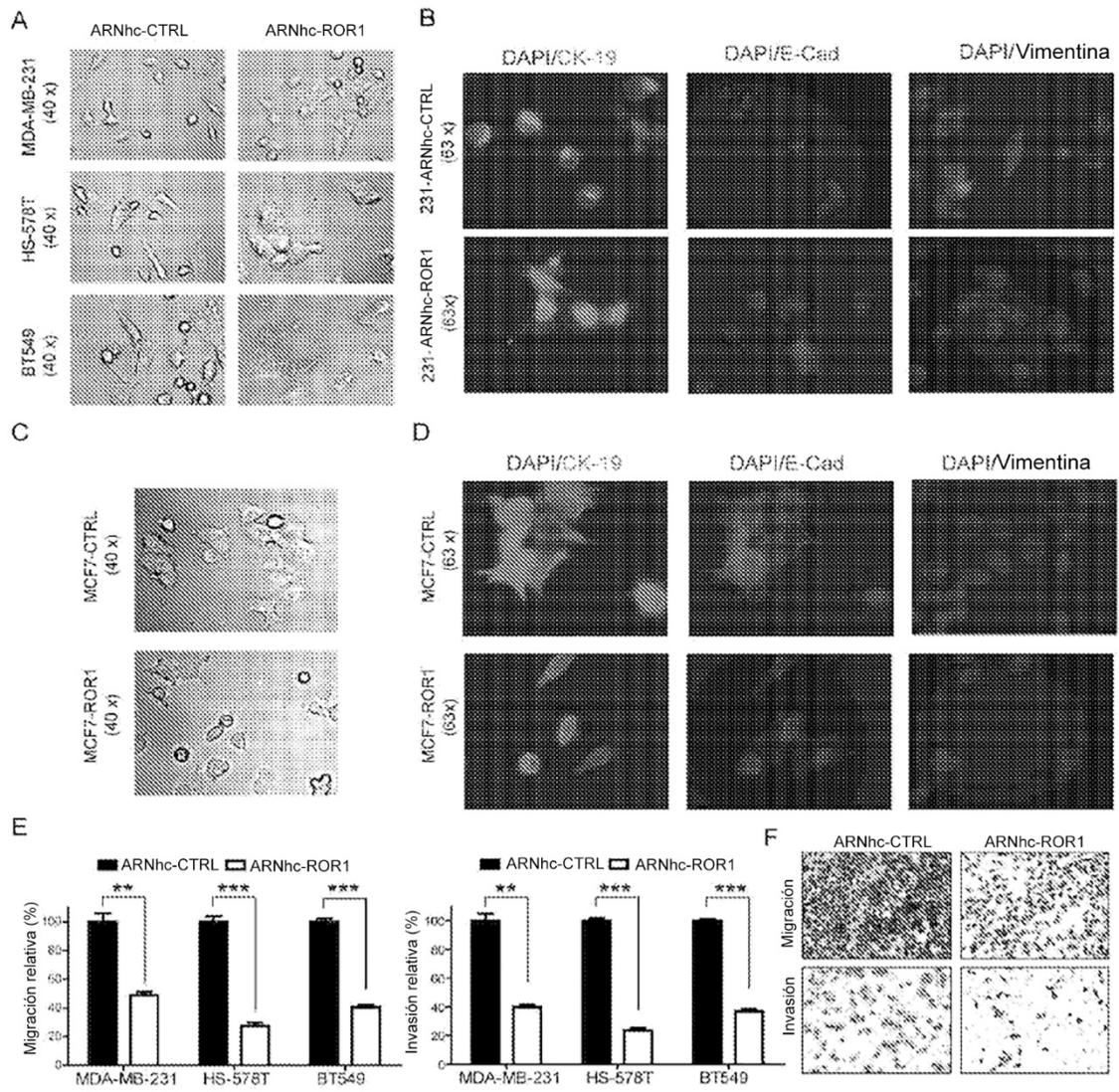


FIG. 2

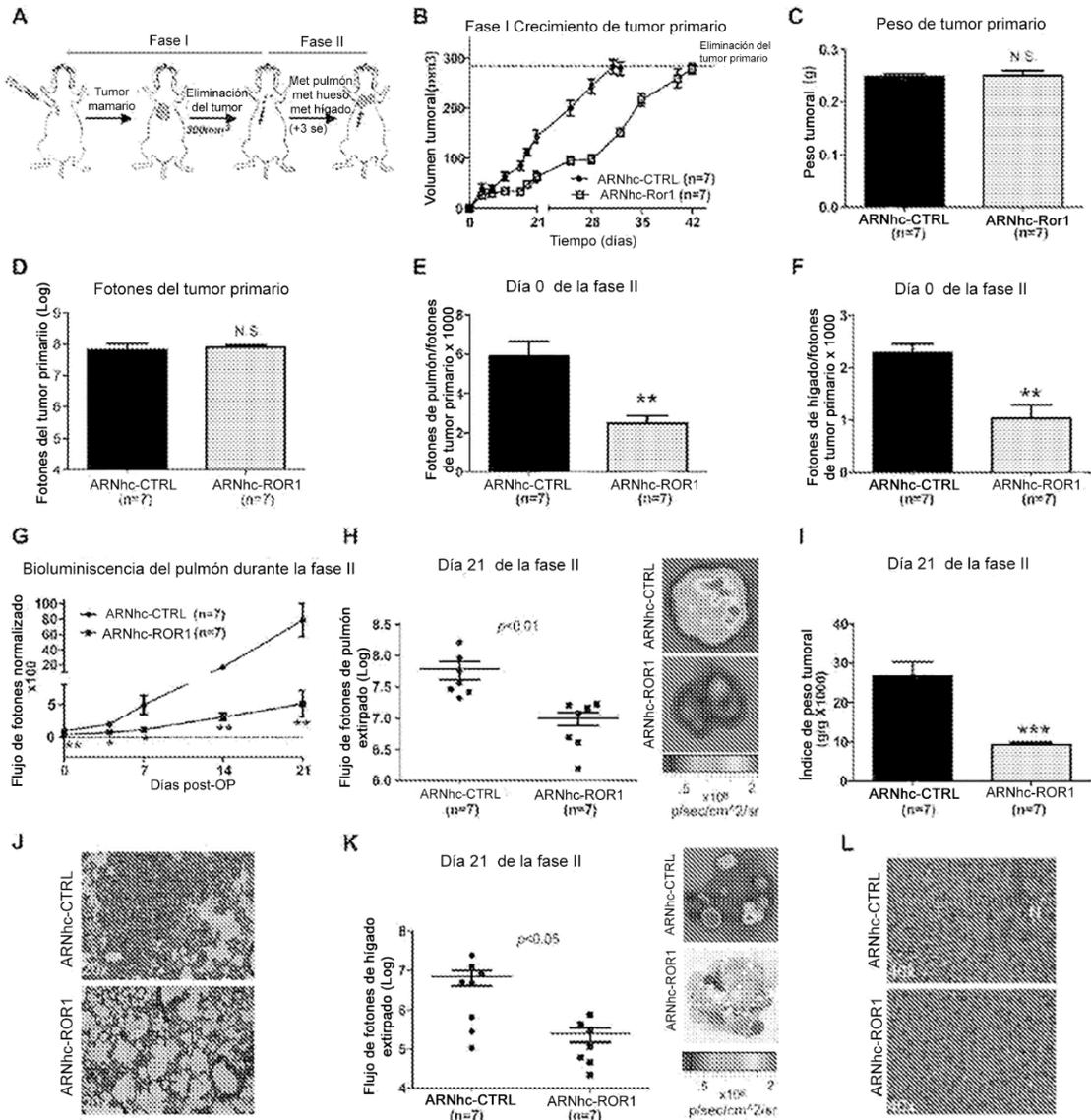


FIG. 3

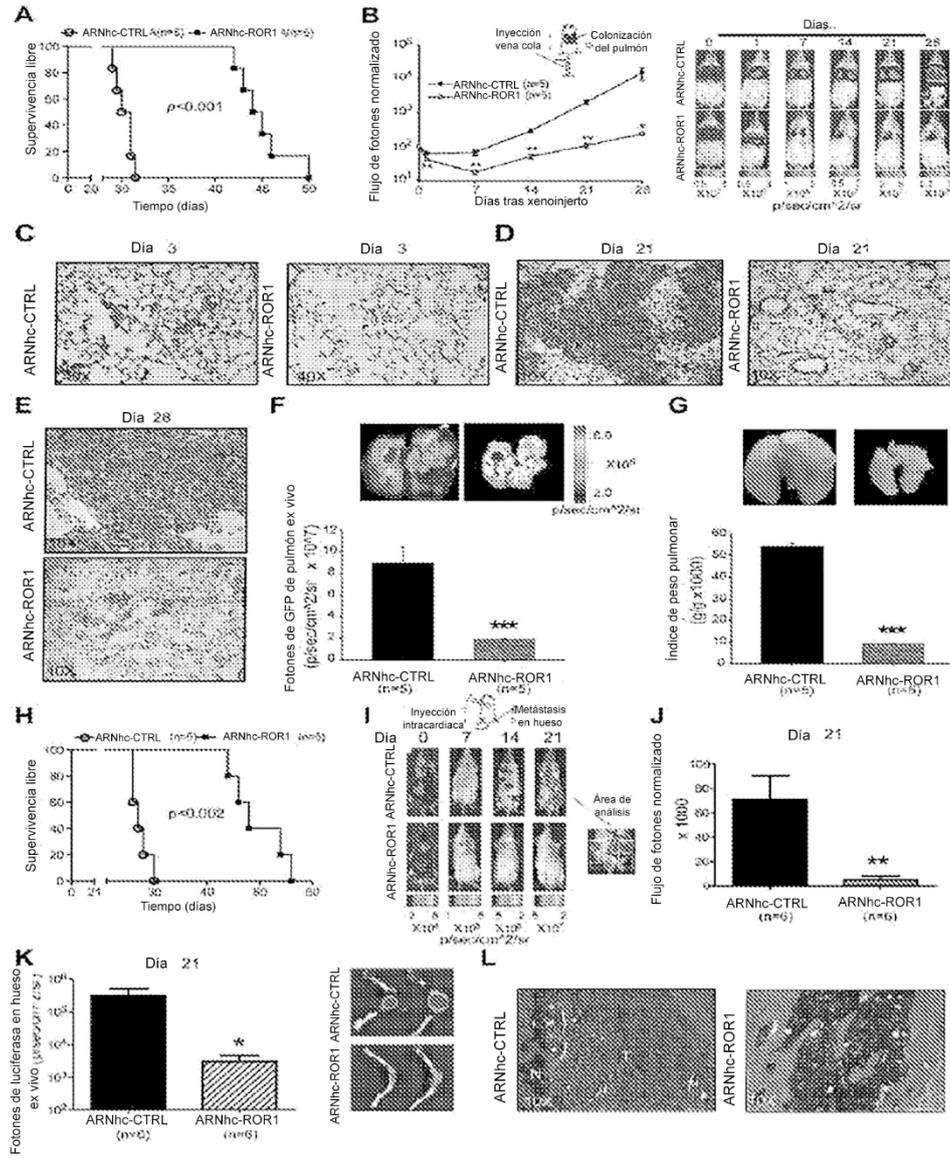


FIG. 4

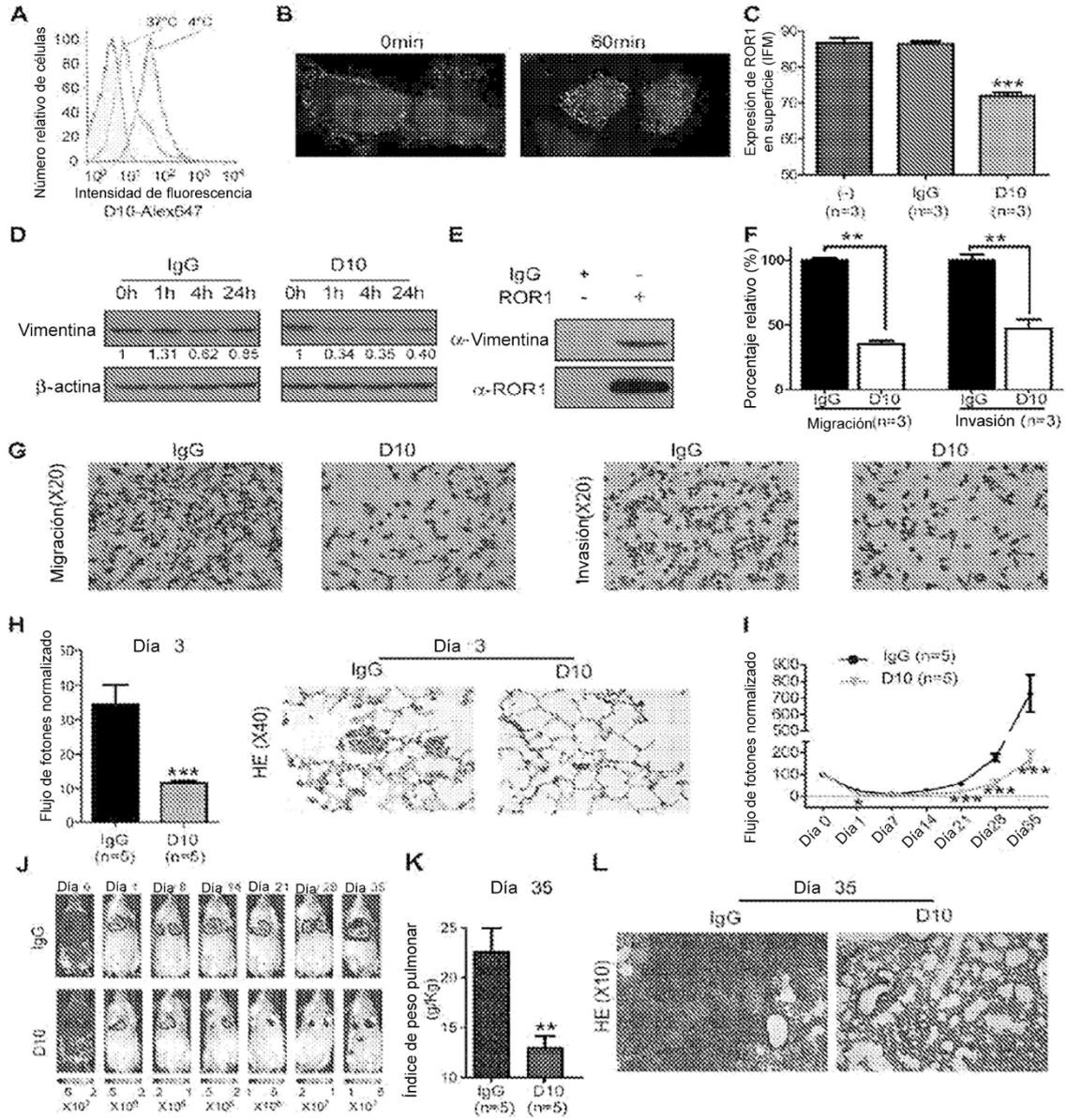


FIG. 5

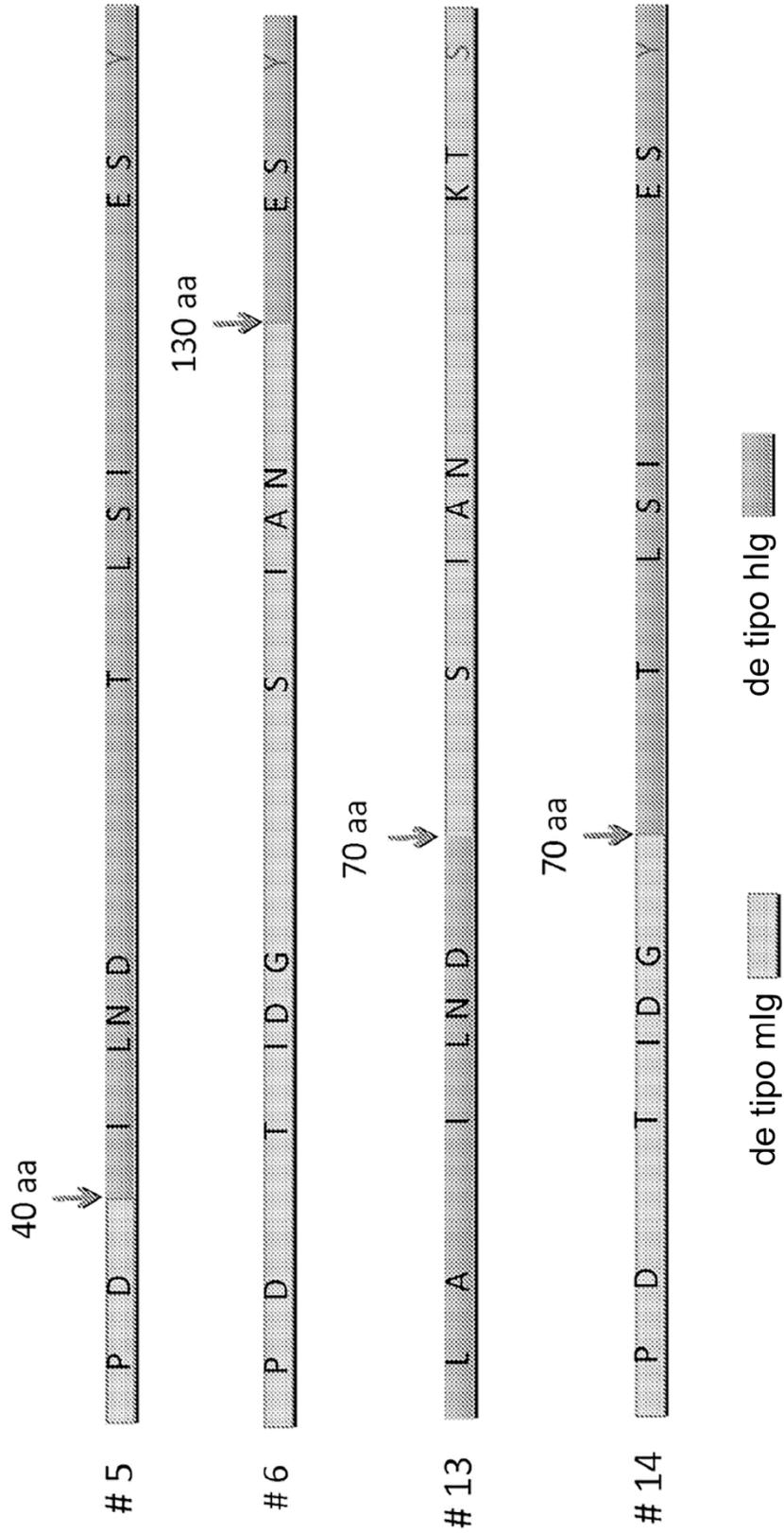
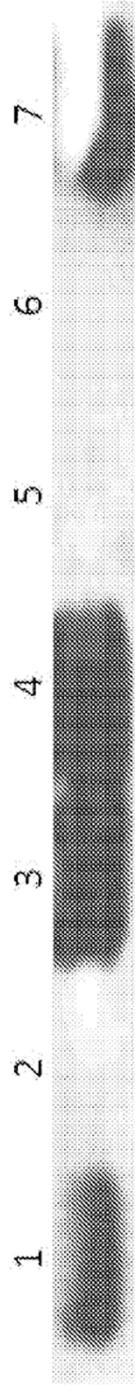
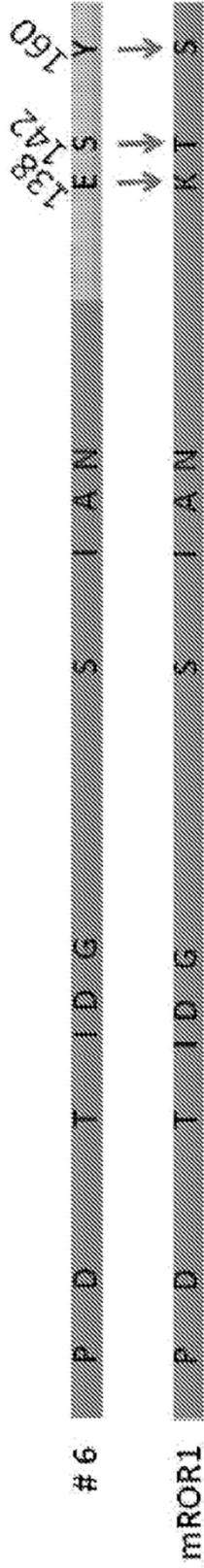
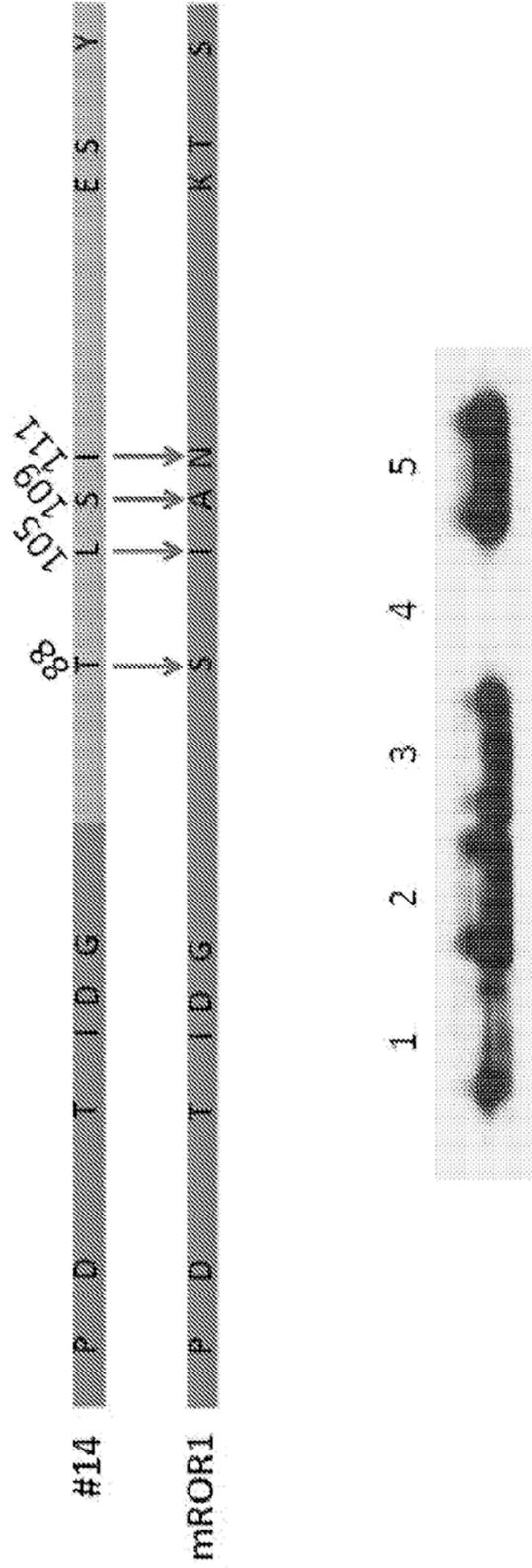


FIG. 6



1. HuROR1
2. HuROR1 con E->K @138
3. HuROR1 con S->T @142
4. HuROR1 con Y->S @160
5. HuROR1 con E->K @138 & S->T @142
6. HuROR1 con E->K @138 & Y->S @160
7. HuROR1 con S->T @142 & Y->S @160

FIG. 7



1. HuROR1 con T->S @ 88
2. HuROR1 con L->I @ 105
3. HuROR1 con S->I @ 109
4. HuROR1 con I->N @ 111
5. HuROR1

FIG. 8

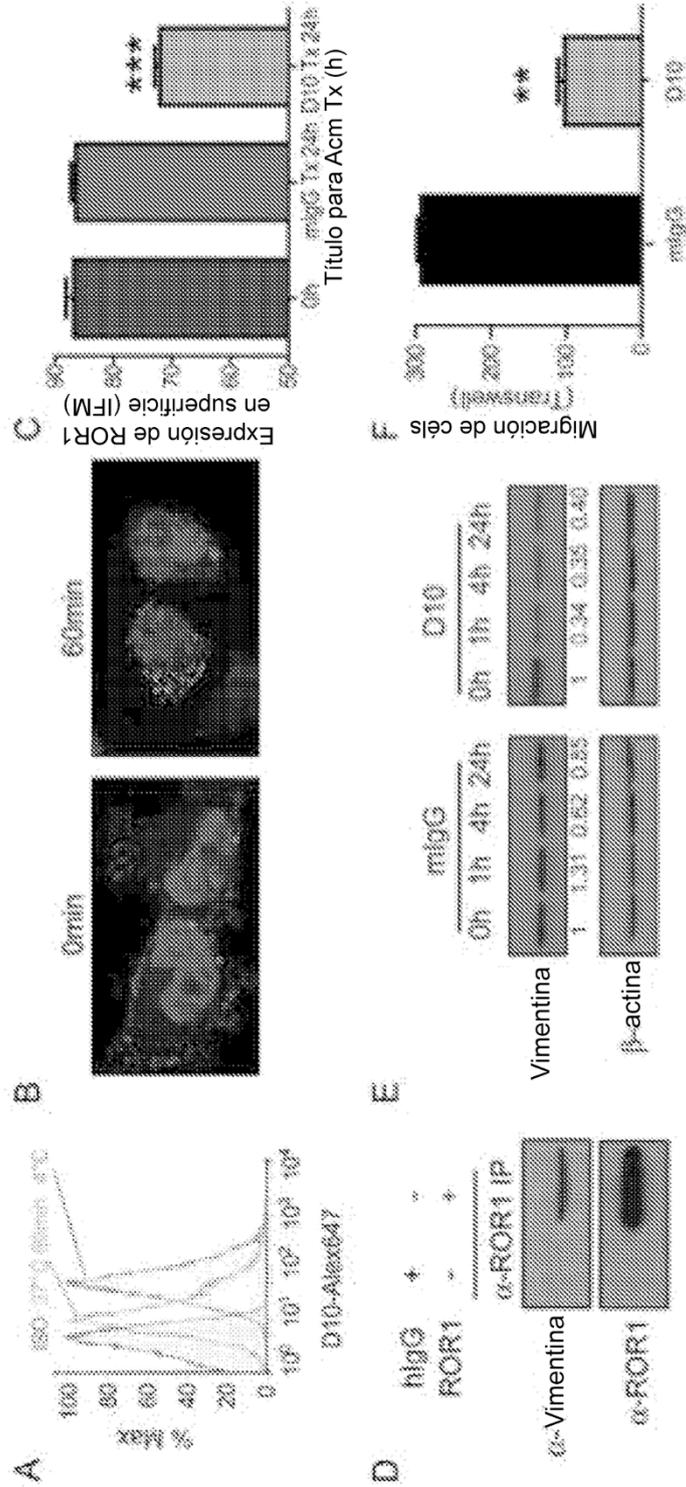


FIG. 9

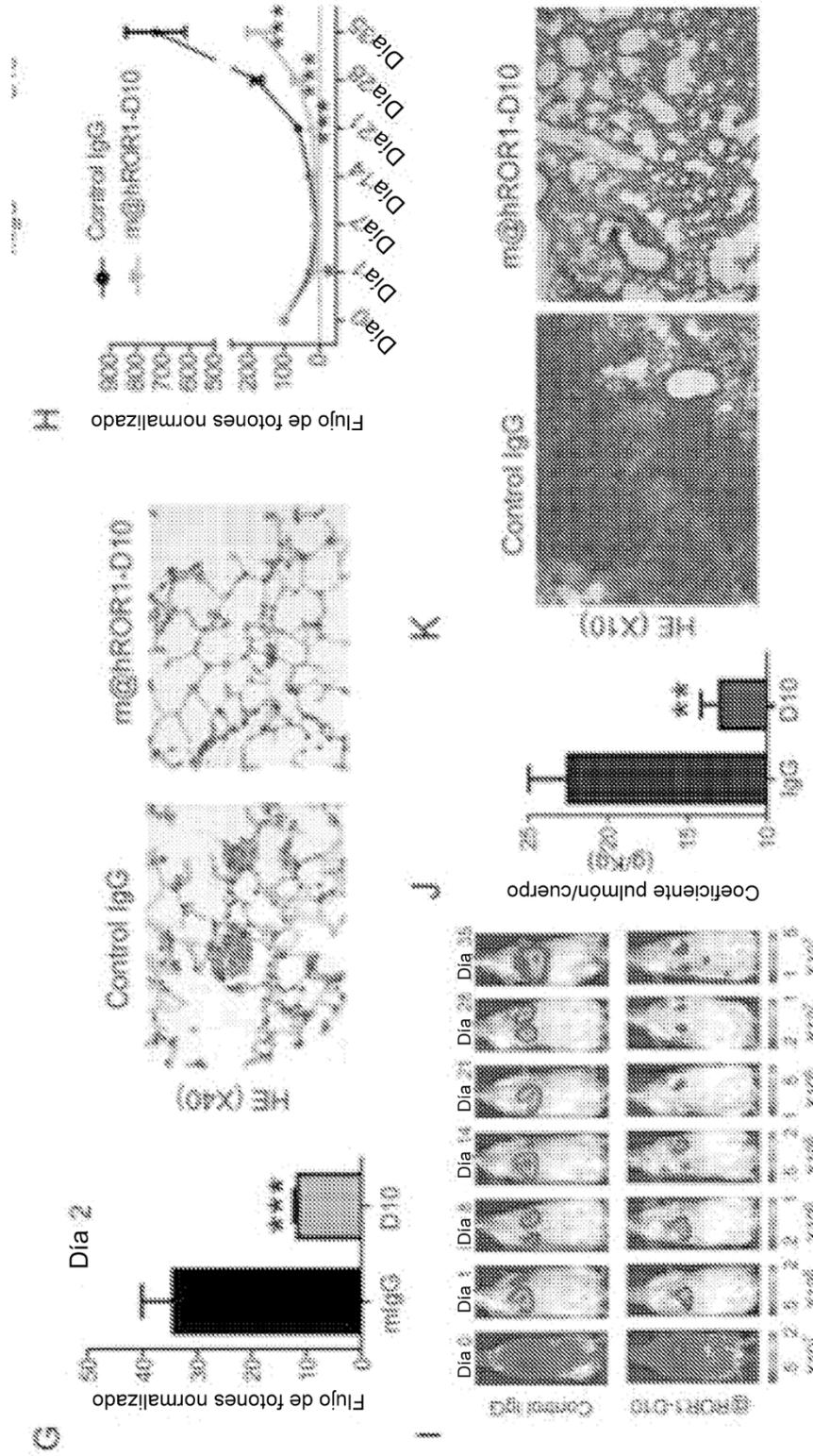
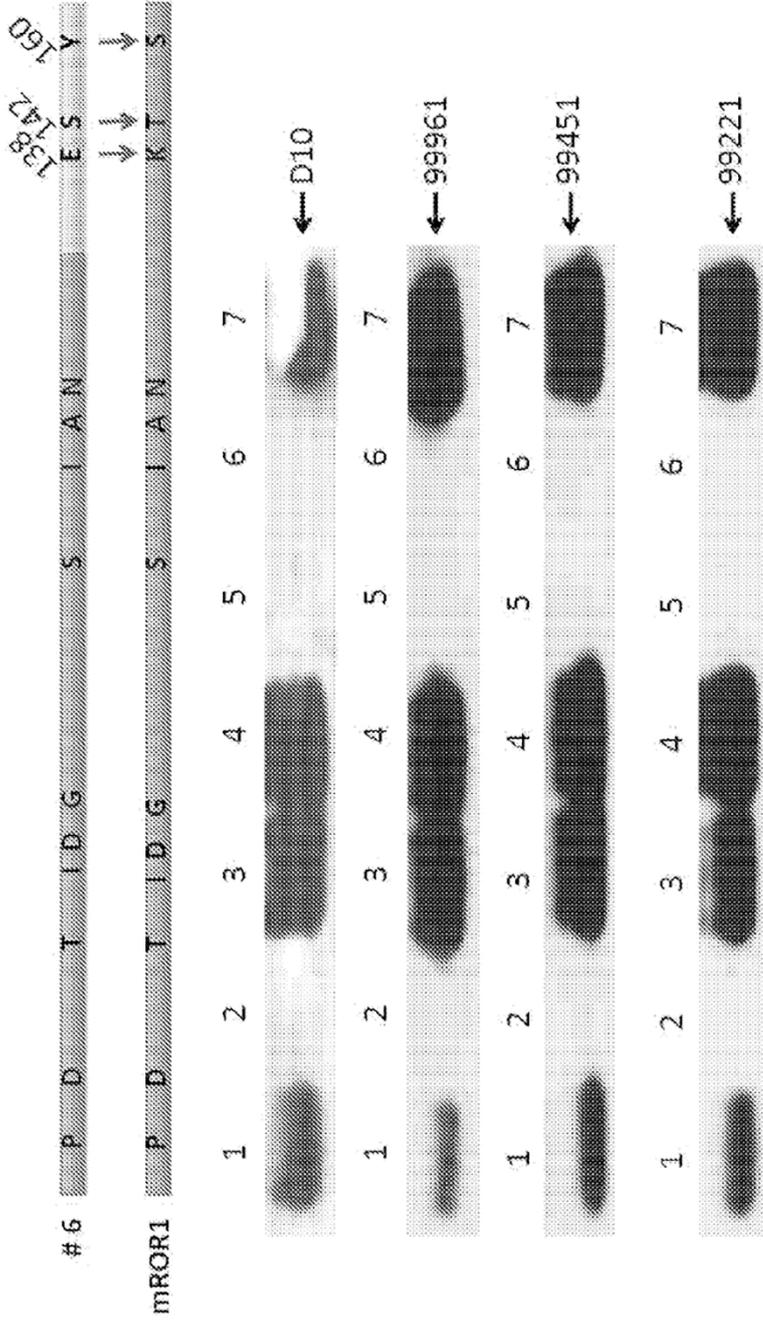


FIG. 9 (cont)



1. HuROR1
2. HuROR1 con E->K @138
3. HuROR1 con S->T @142
4. HuROR1 con Y->S @160
5. HuROR1 con E->K @138 & S->T @142
6. HuROR1 con E->K @138 & Y->S @160
7. HuROR1 con & S->T @142 & Y->S @160

FIG. 10

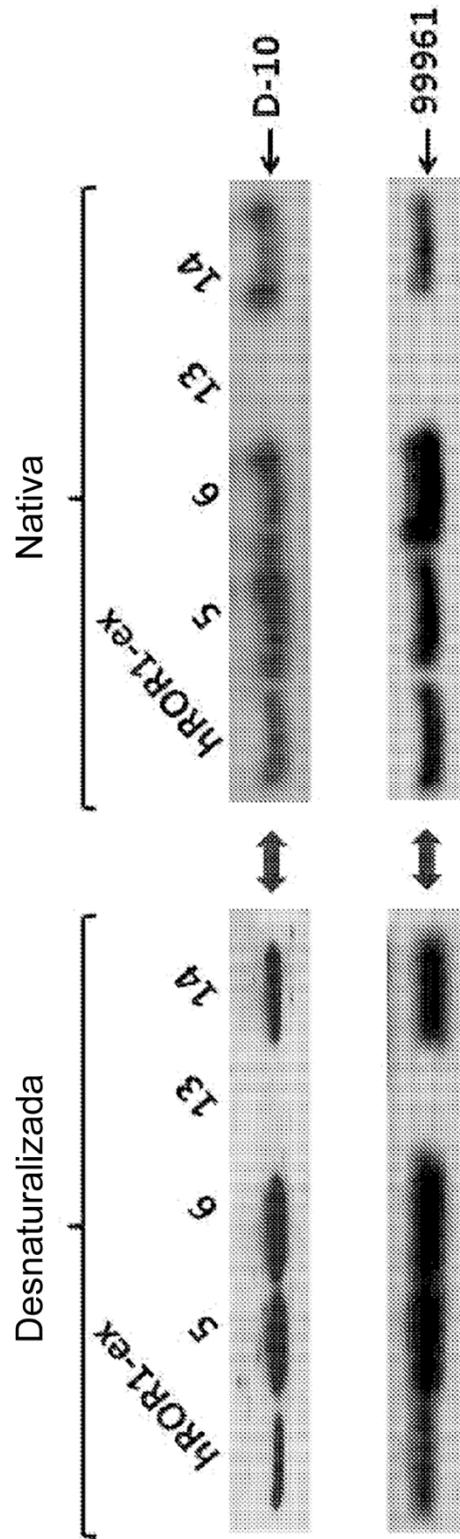


FIG. 11

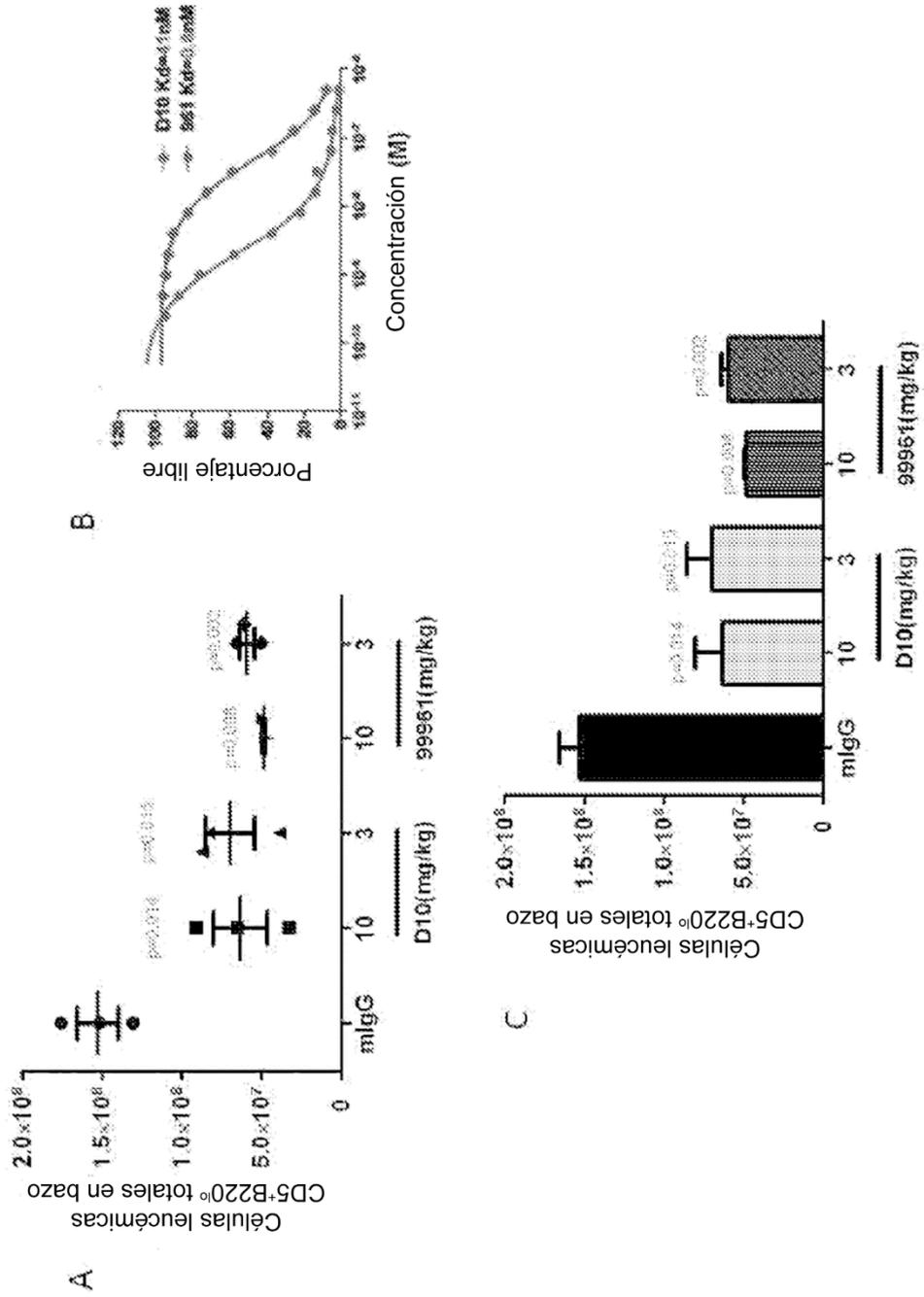


FIG. 12

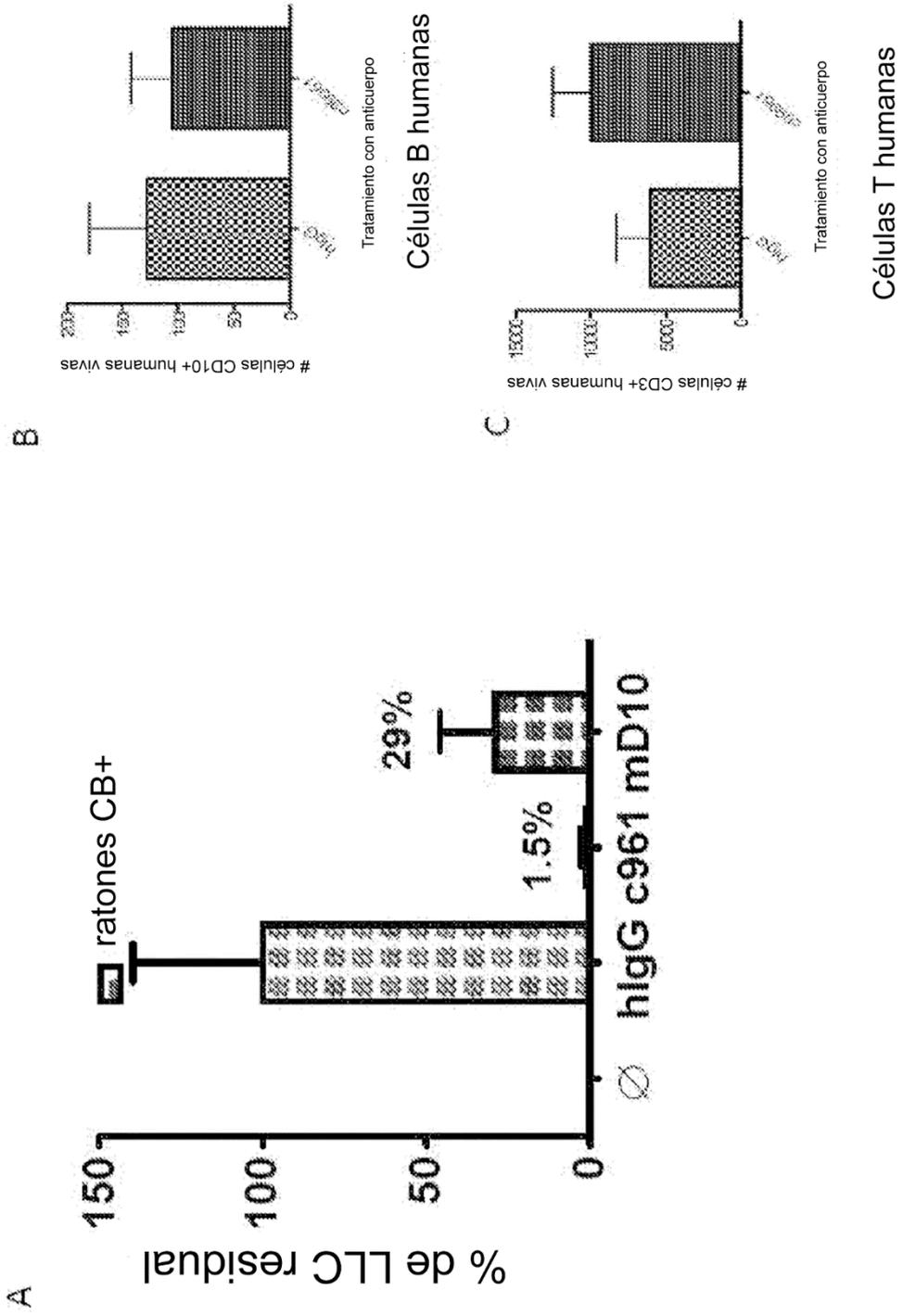


FIG. 13

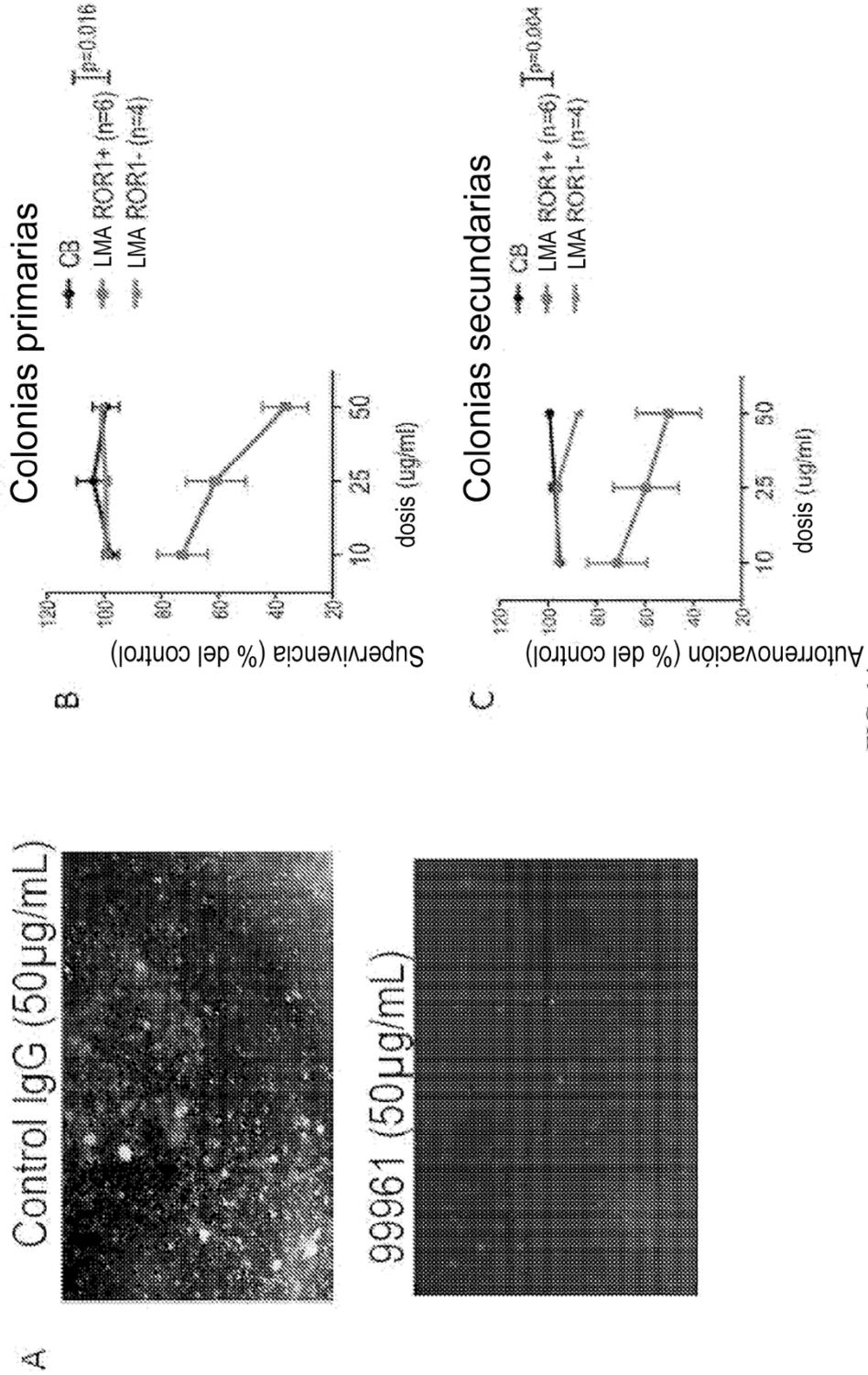


FIG. 14

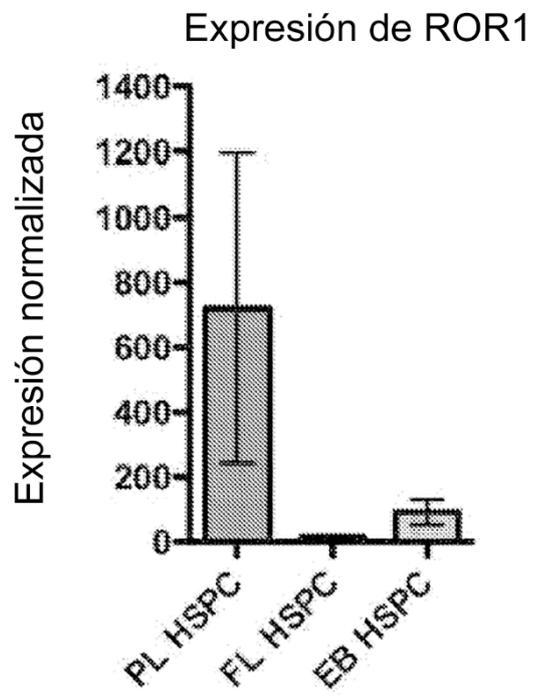


FIG. 15

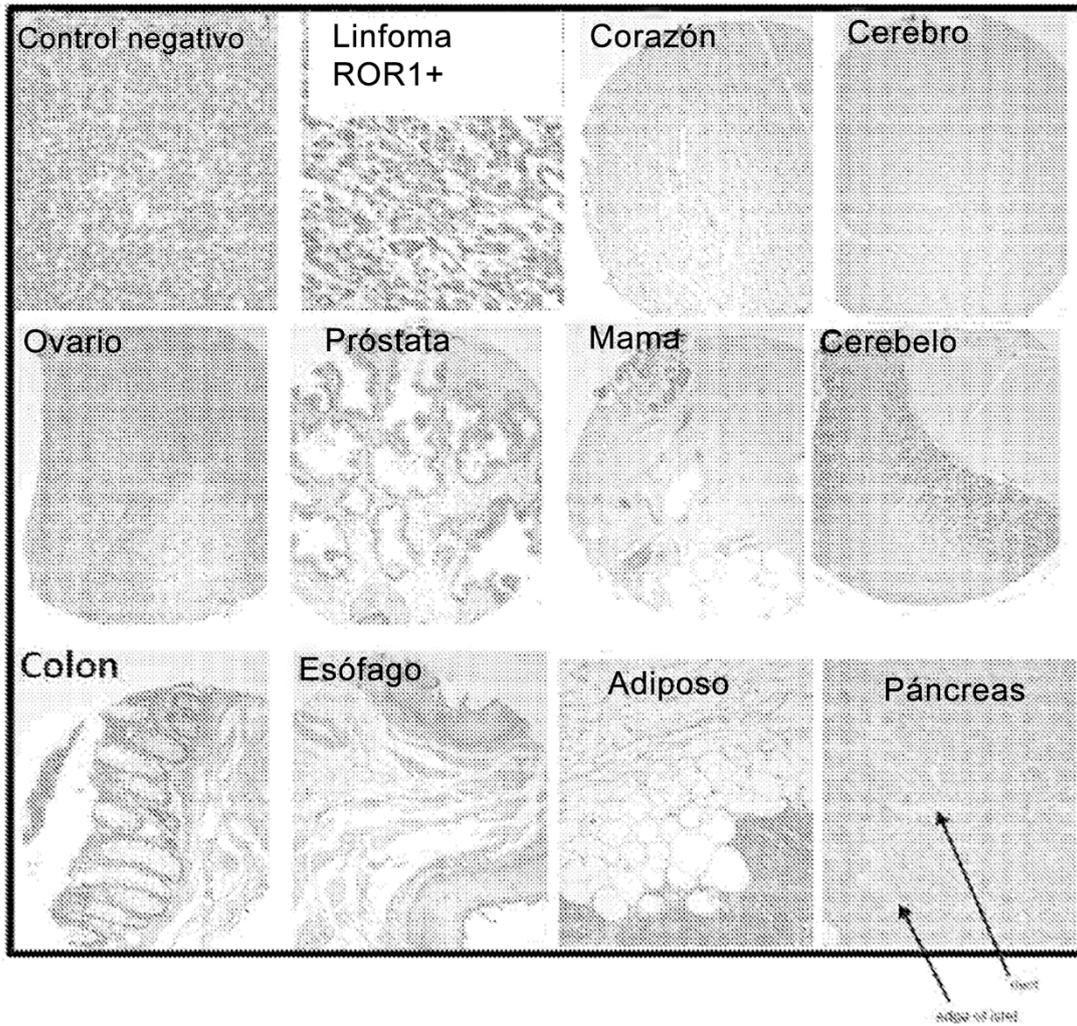


FIG. 16

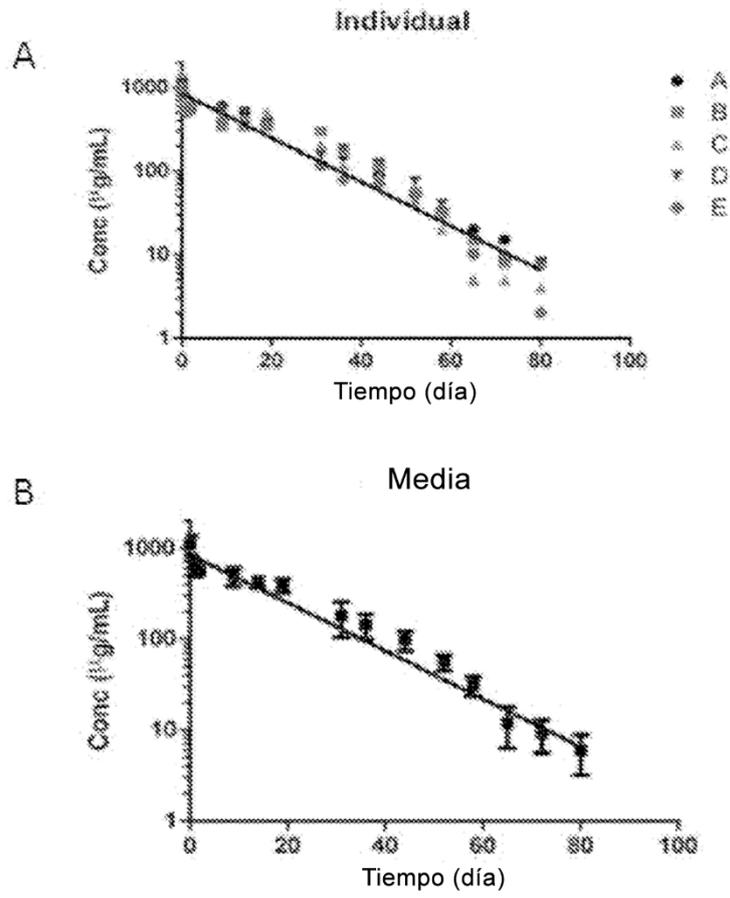


FIG. 17

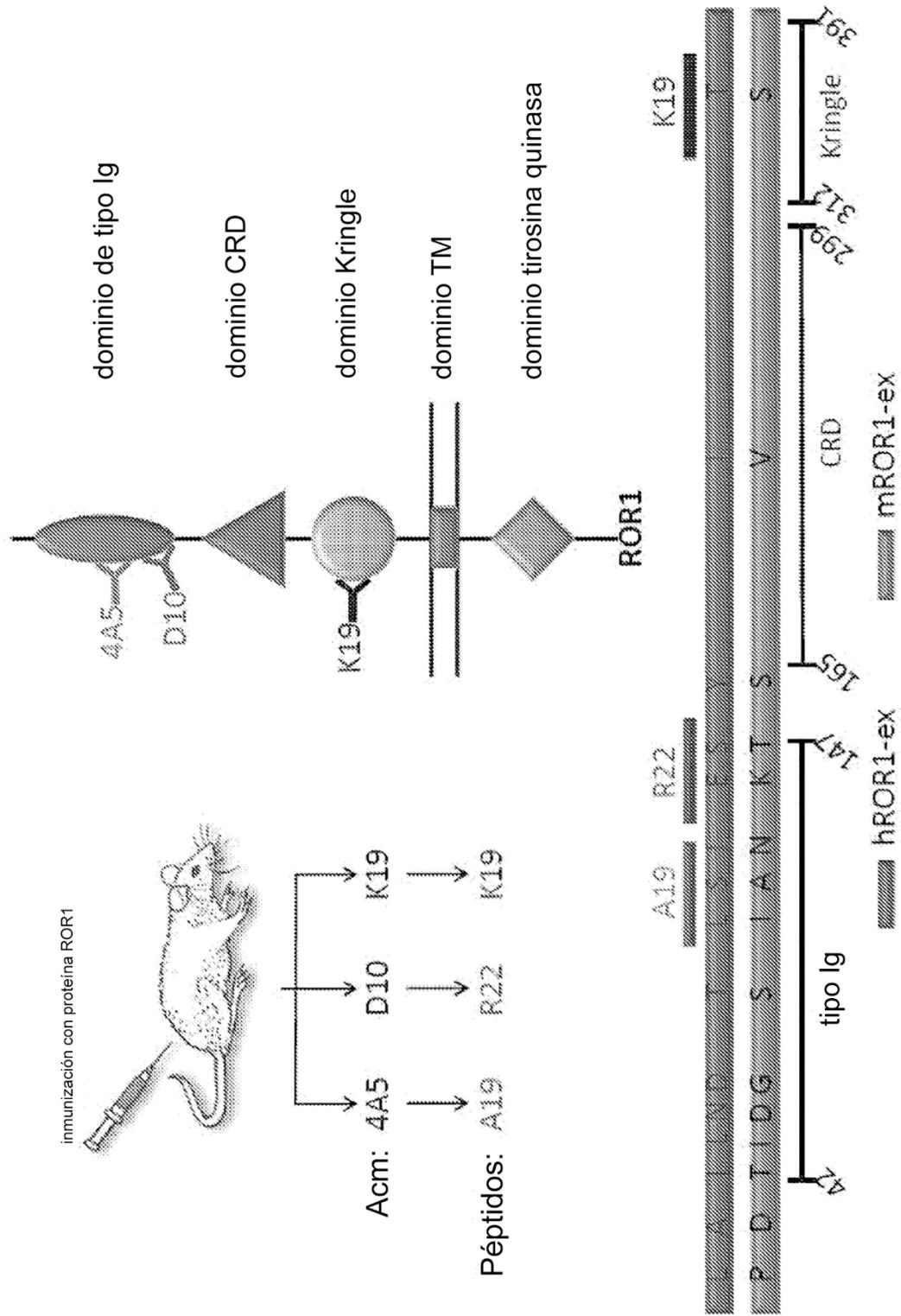


FIG. 18

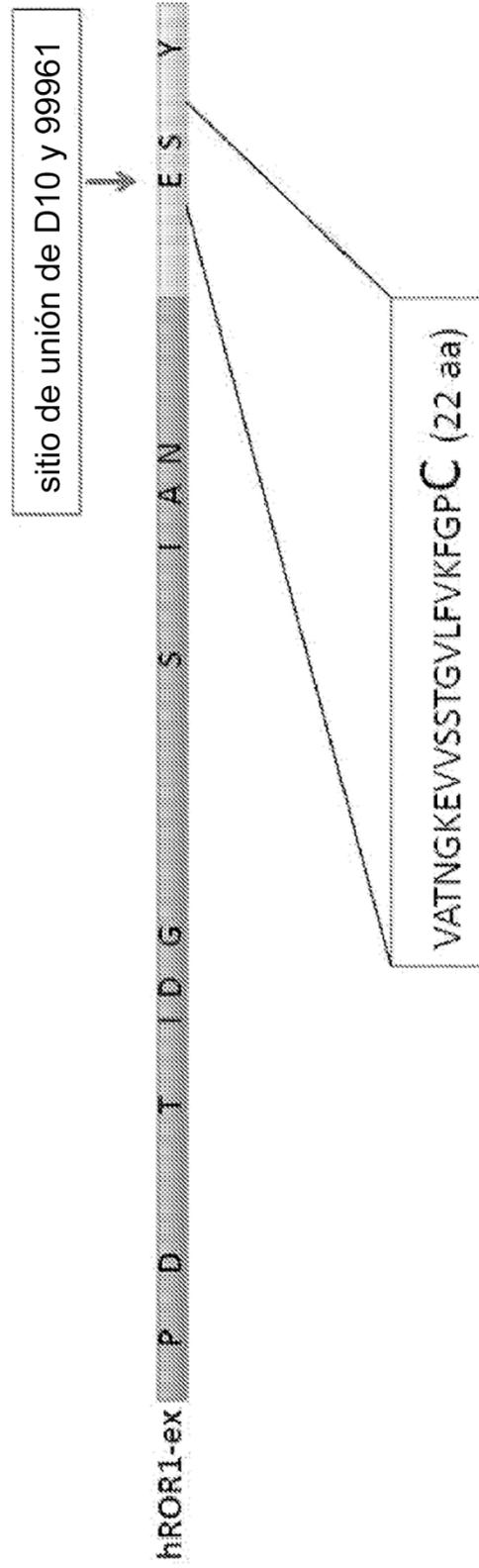


FIG. 20

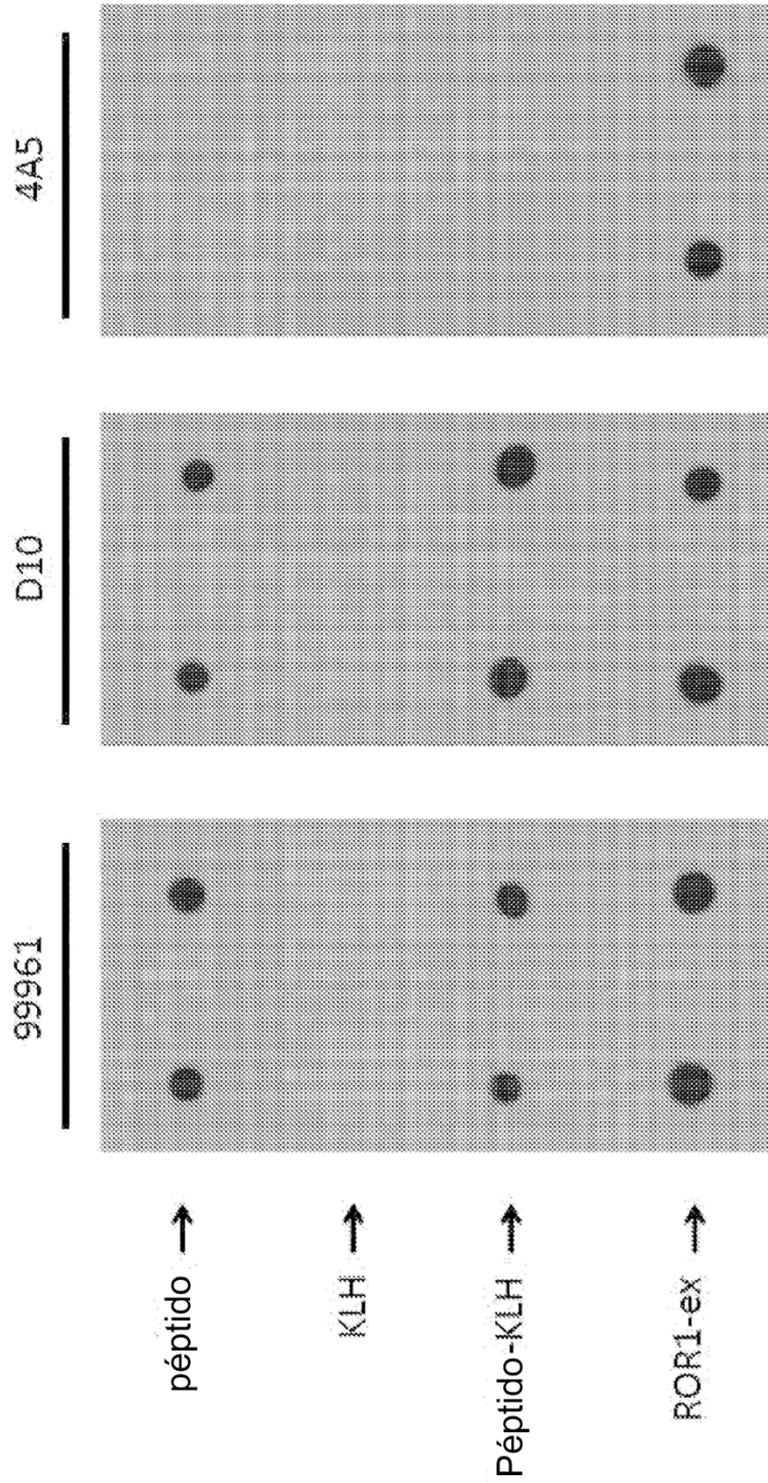


FIG. 21

Grupo	Raton	Numero	Inmunizaciones	Inyeccion	Cambios
1	BALB/c	N=5	(-)	(-)	(-)
2	BALB/c	N=5	KLH	s.c	100 µg/ratón
3	BALB/c	N=5	R22-KLH	s.c	100 µg/ratón

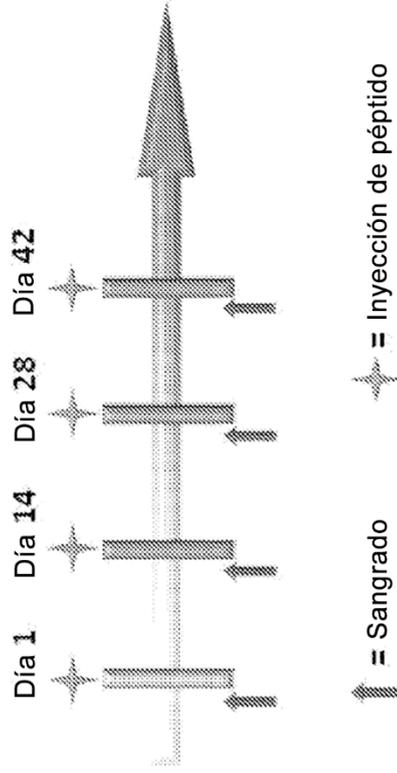


FIG. 22

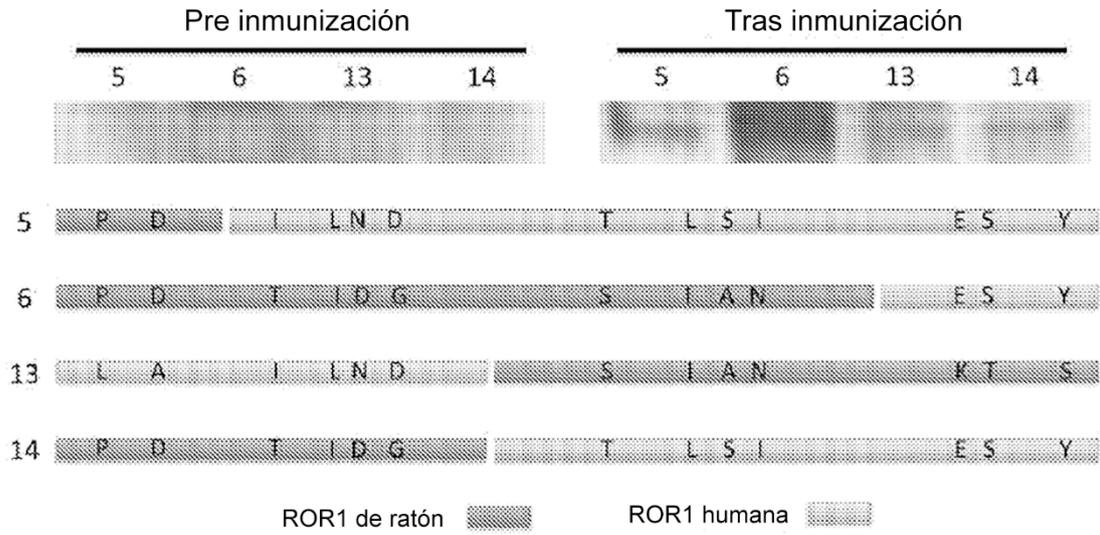


FIG. 23

Grupo	Ratón	Número	Inmunización	Inyección	Cantidad
1	C57BL/6	N=8	(-)	(-)	(-)
2	C57BL/6	N=8	KLH	s.c	100 µg/ratón
3	C57BL/6	N=8	R22-KLH	s.c	100 µg/ratón

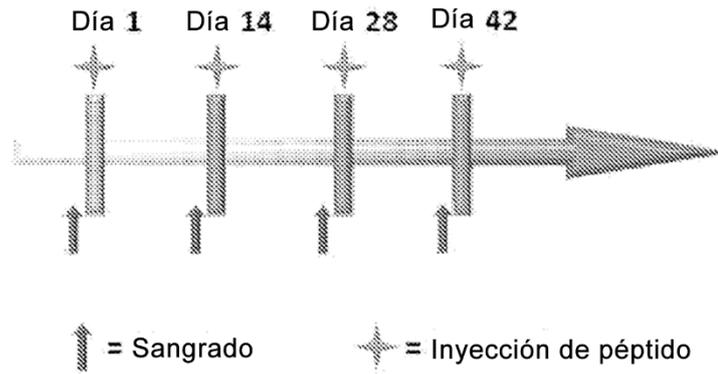


FIG. 24

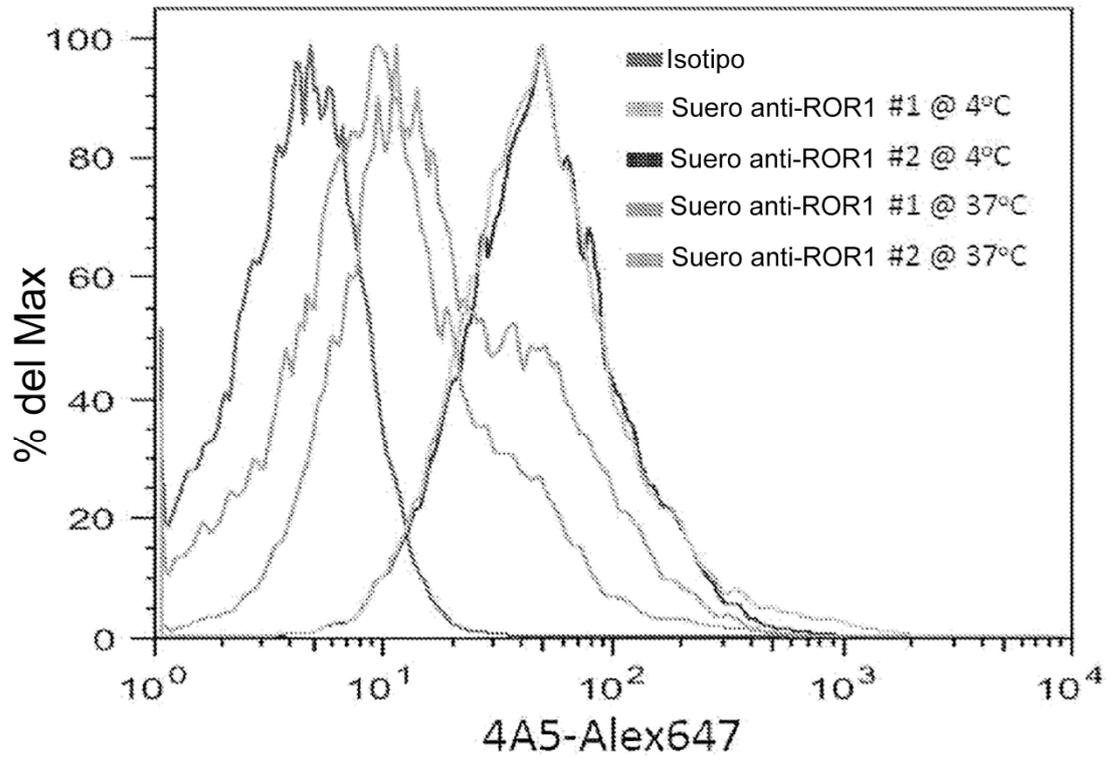


FIG. 25

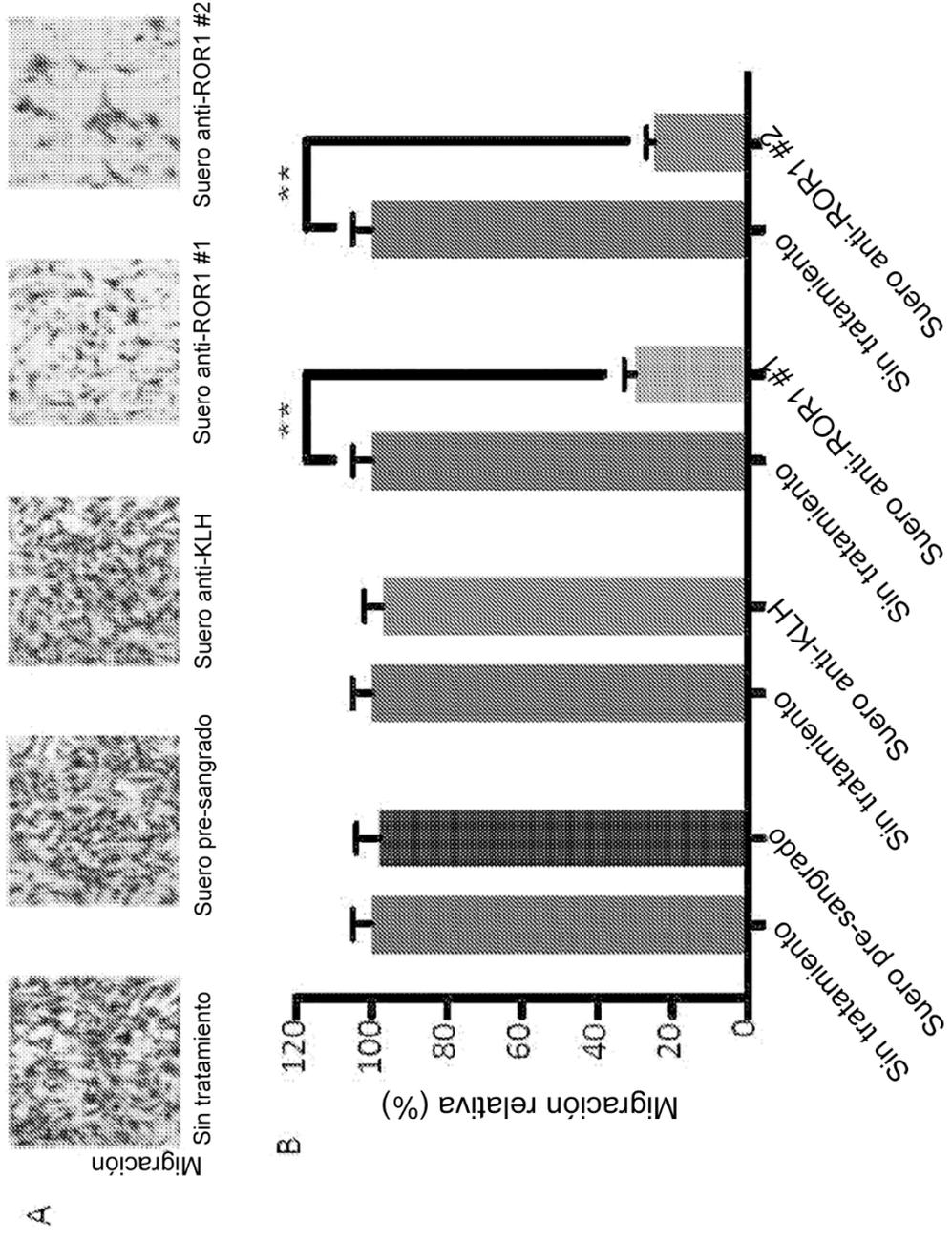


FIG. 9

Grupo	Ratón	Número	Inmunización	Inyección	Cantidad
1	C57BL/6	N=6	(-)	(-)	(-)
2	C57BL/6	N=6	KLH	s.c	100 µg/ratón
3	C57BL/6	N=6	R22-KLH	s.c	100 µg/ratón

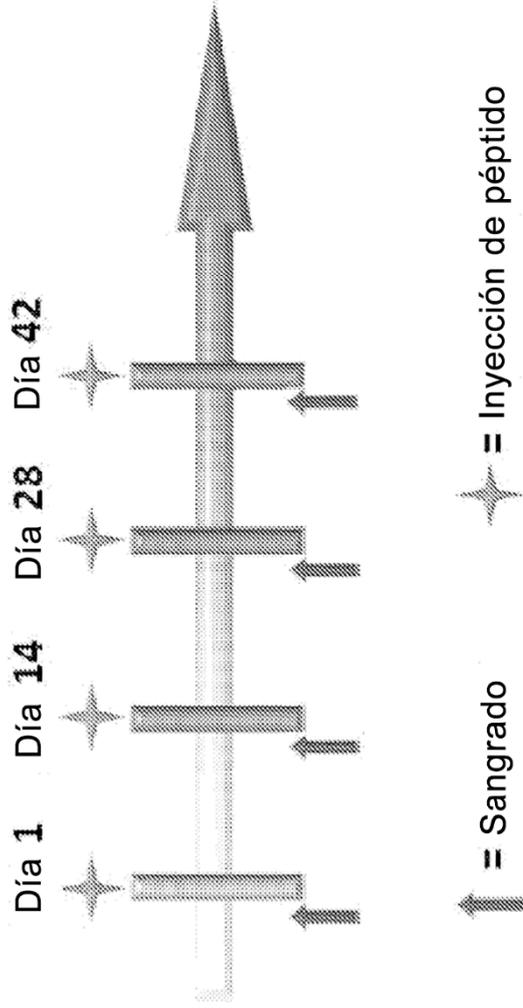


FIG. 27

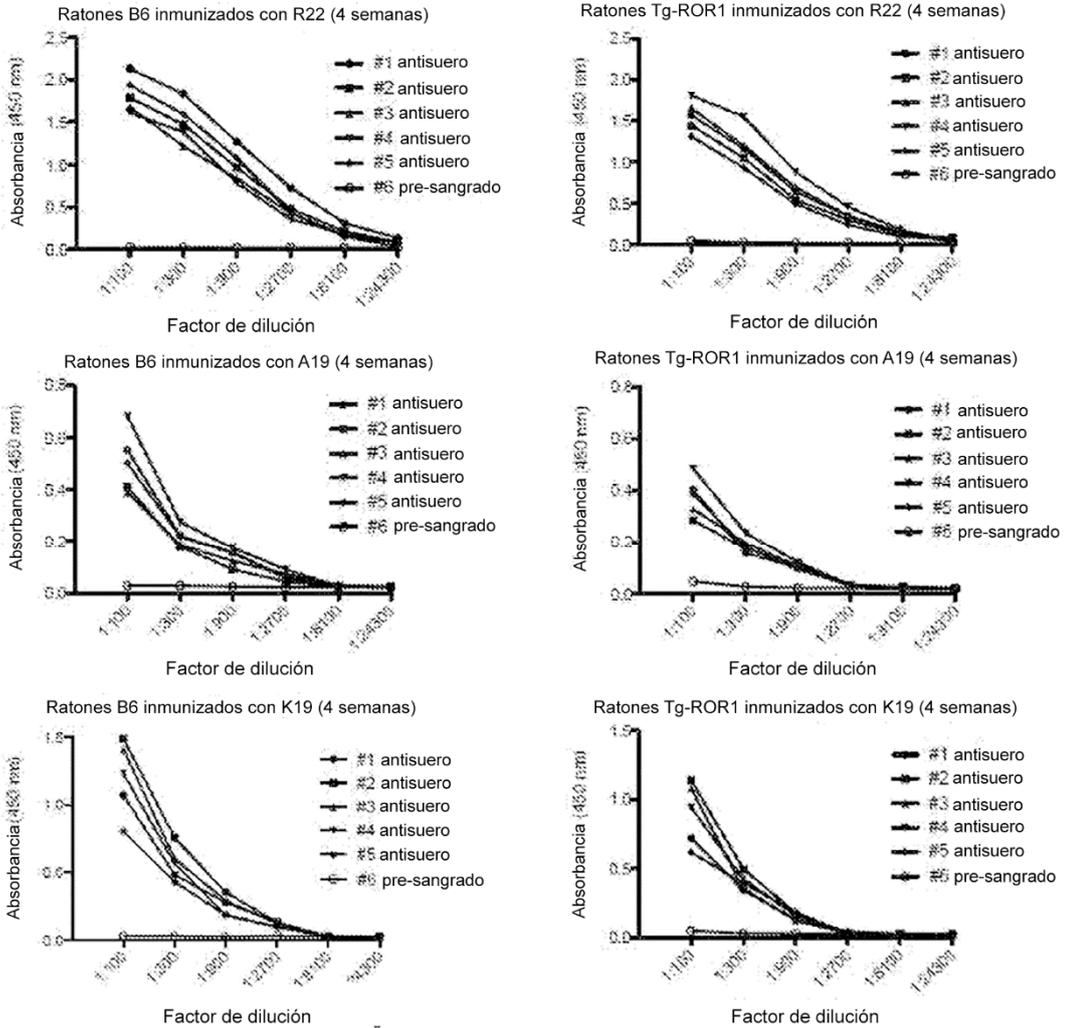


FIG. 28

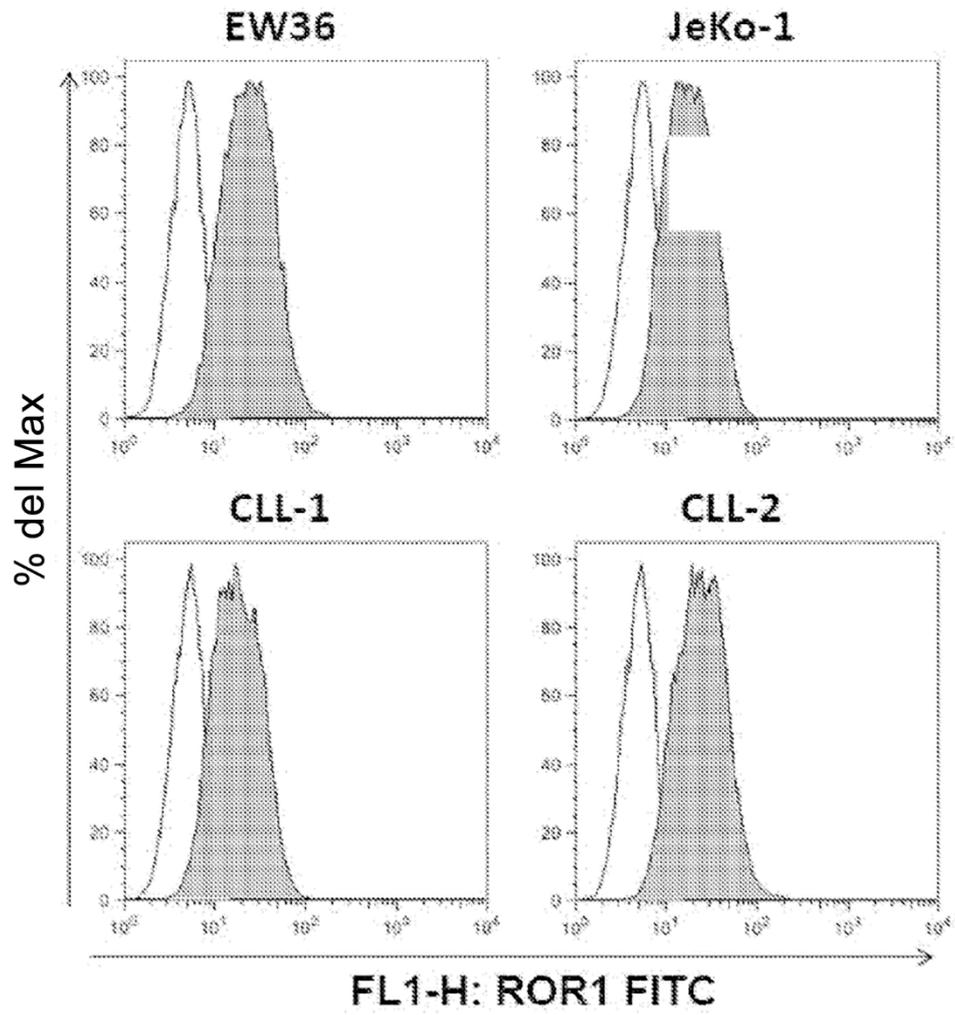


FIG. 29

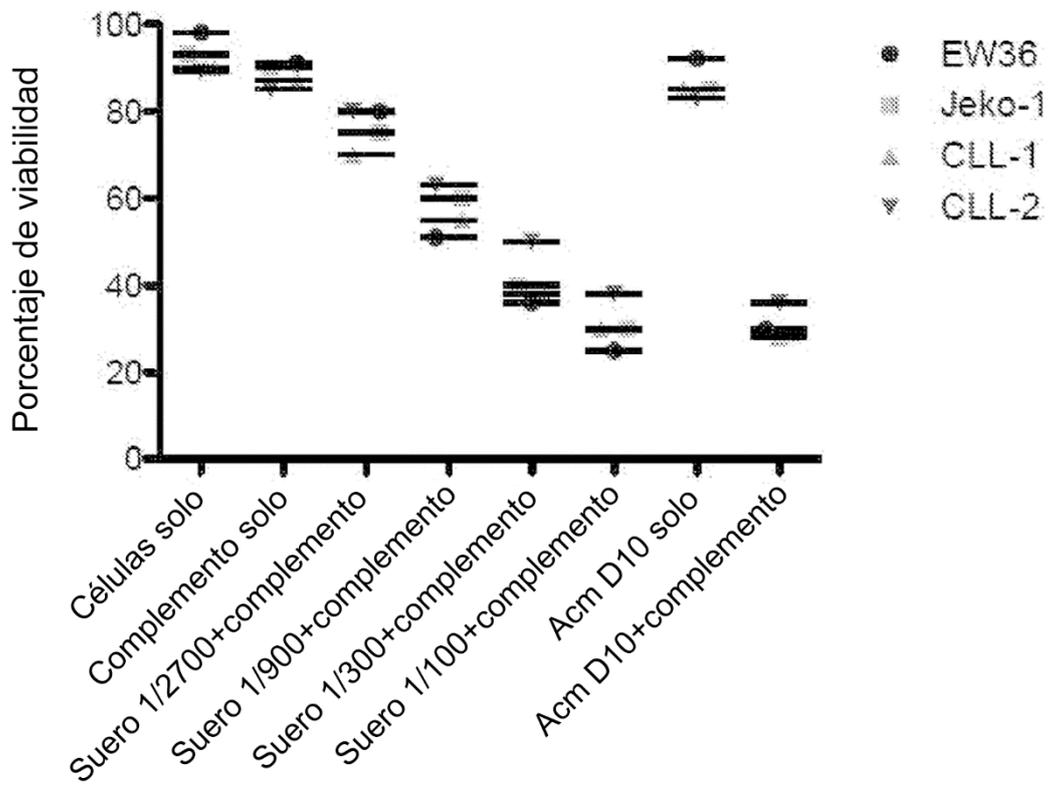


FIG. 30

Grupo	Ratón	Número	Inmunización	Inyección	Cantidad
1	C57BL/6	N=6	(-)	(-)	(-)
2	C57BL/6	N=6	KLH	s.c	100 µg/ratón
3	C57BL/6	N=6	R22-KLH	s.c	100 µg/ratón

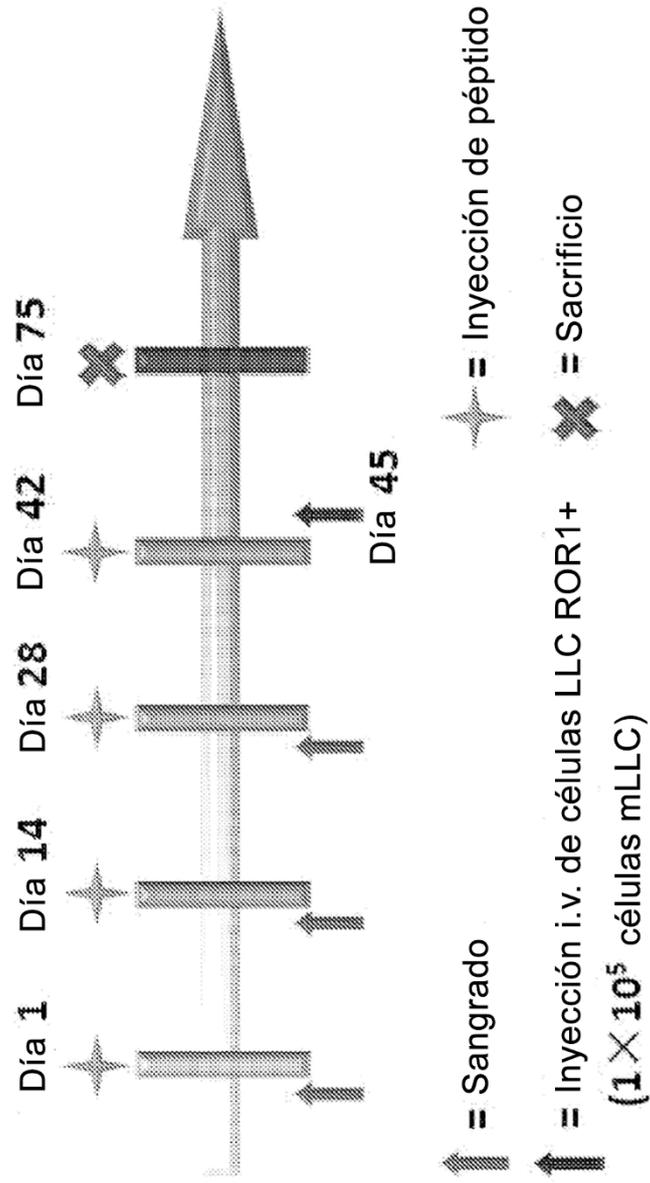


FIG. 31

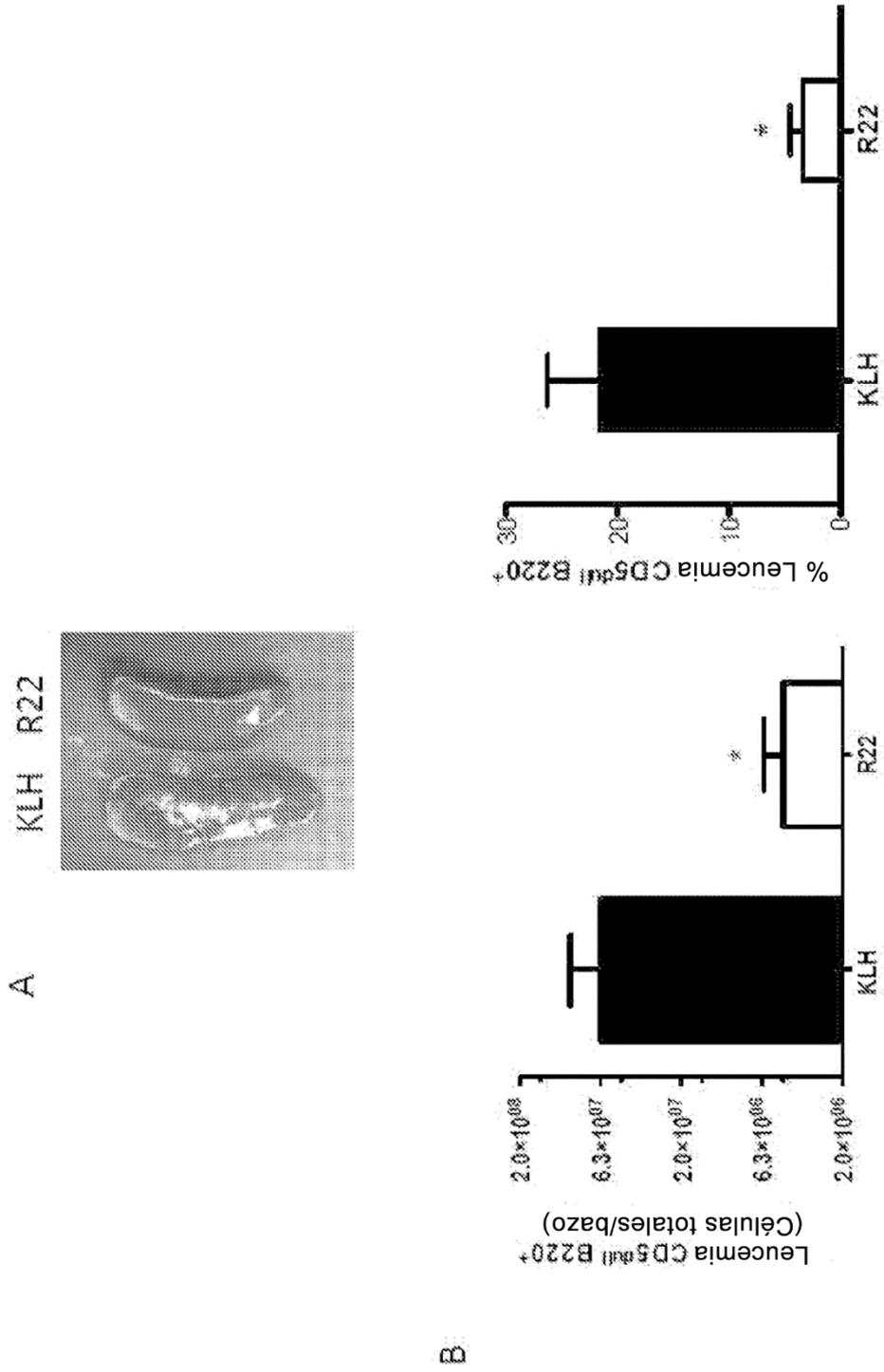


FIG. 32

Grupo	Ratón	Número	Inmunización	Inyección	Cantidad
1	C57BL/6	N=4	(-)	(-)	(-)
2	C57BL/6	N=4	KLH	s.c	100 µg/ratón
3	C57BL/6	N=4	R22-KLH	s.c	100 µg/ratón

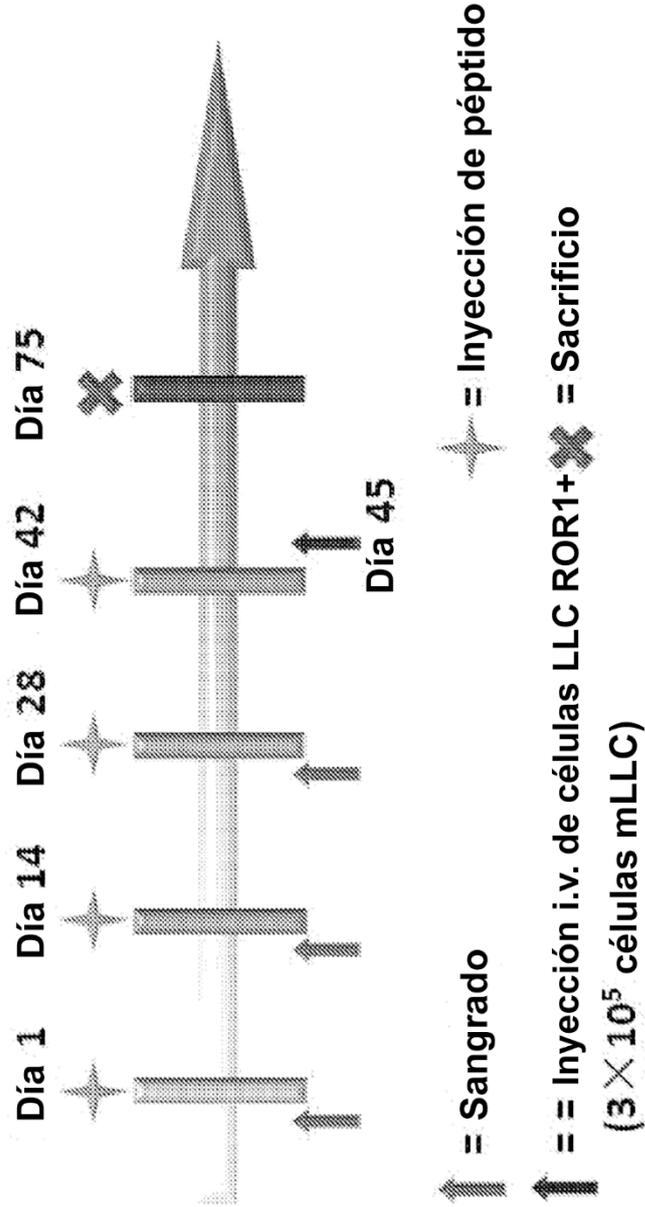


FIG. 33

Inhibición de injerto de leucemia ROR1+ por vacunación con R22 de ratones C57BL/6

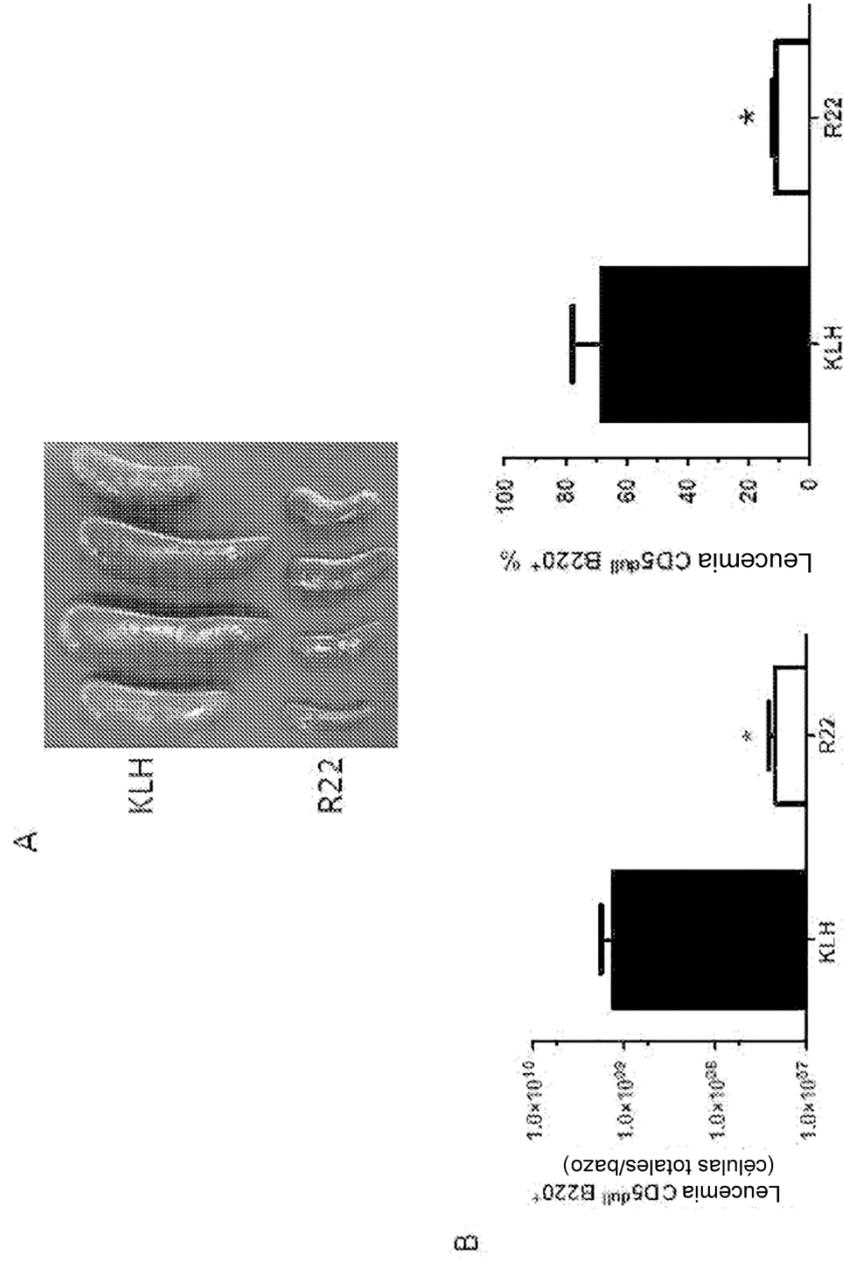
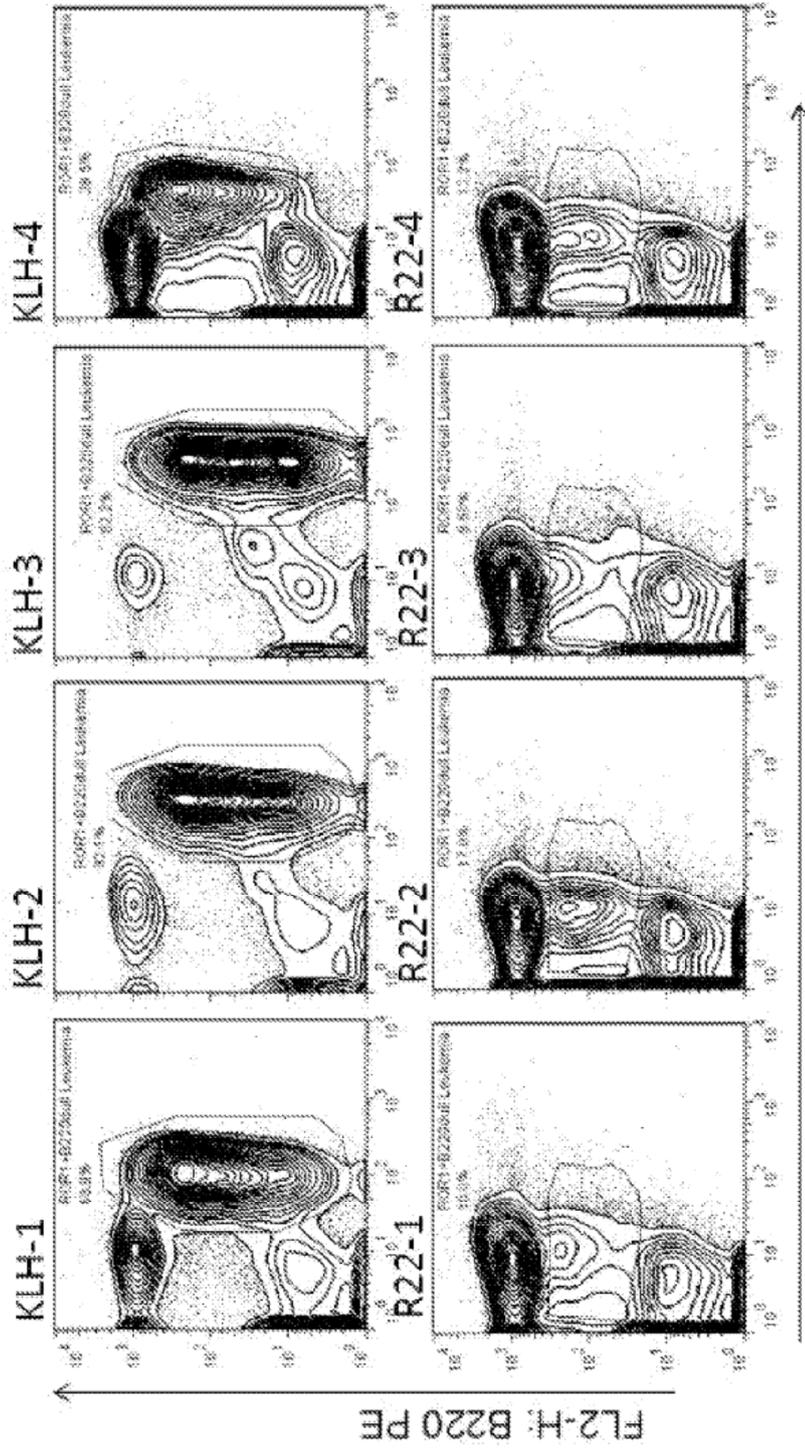


FIG. 34



FL4-H: ROR1 A647

FIG. 35

Disminución de ROR1 en ratones B6 WT inmunizados con R22

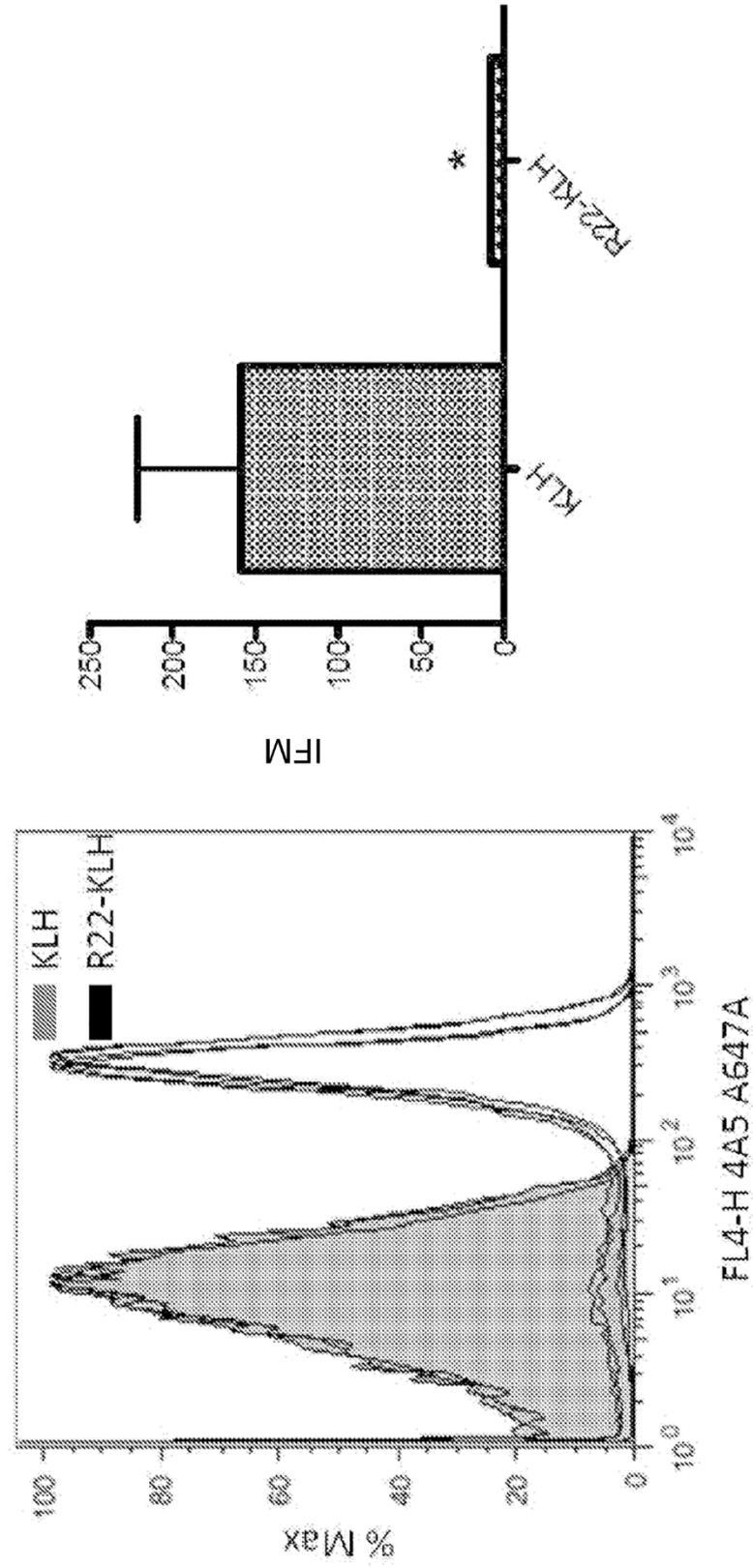


FIG. 36

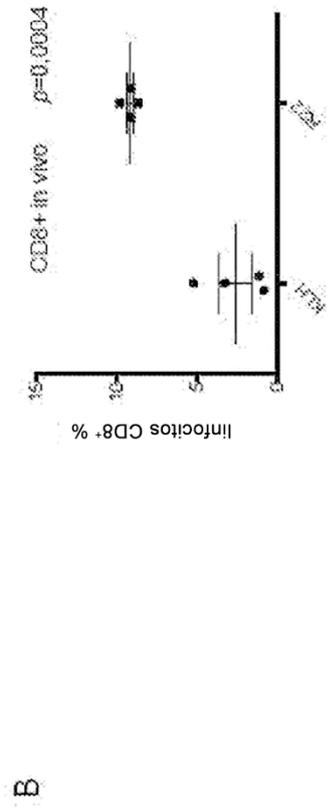
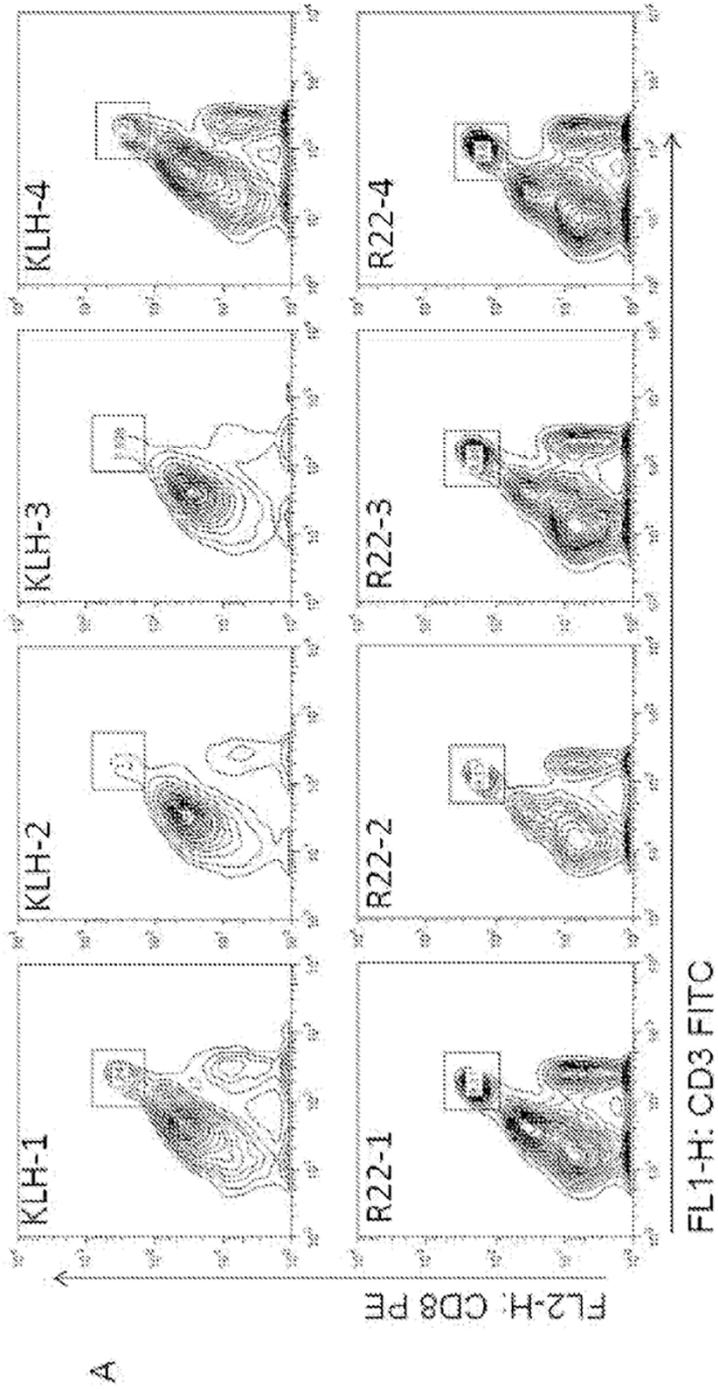


FIG. 37

Grupo	Ratón	Número	Inmunización	Inyección	Cantidad
1	ROR1-Tg	N=5	(-)	(-)	(-)
2	ROR1-Tg	N=5	KLH	s.c	100 µg/ratón
3	ROR1-Tg	N=5	R22-KLH	s.c	100 µg/ratón

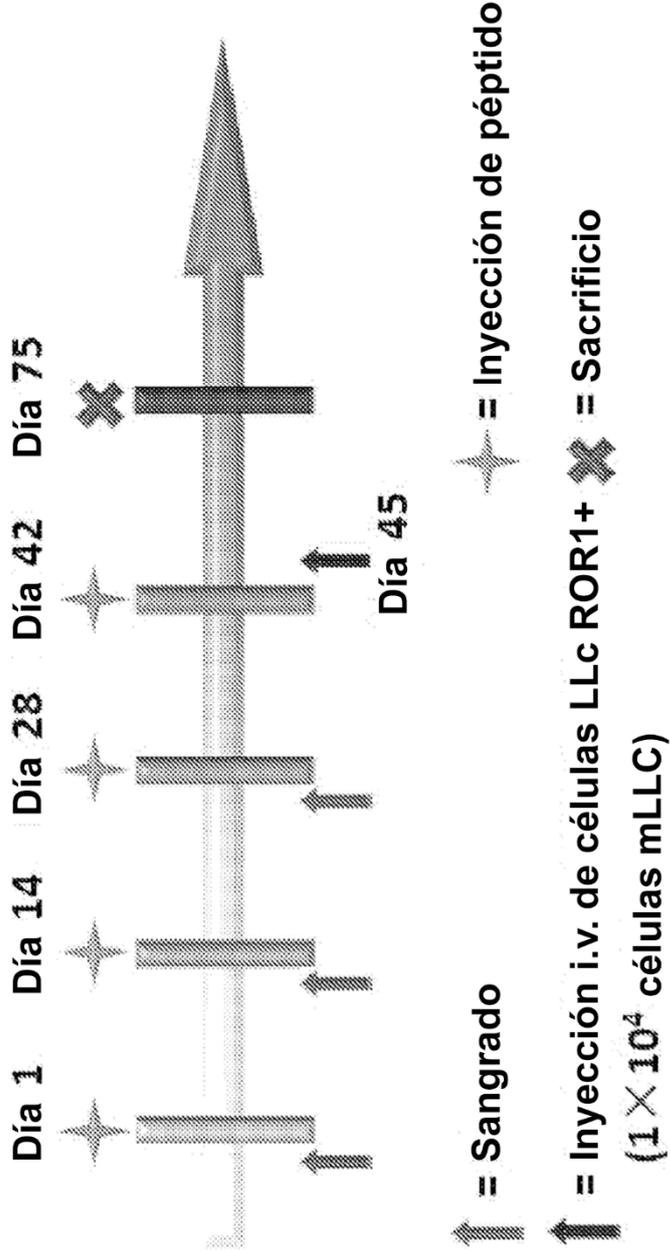


FIG. 38

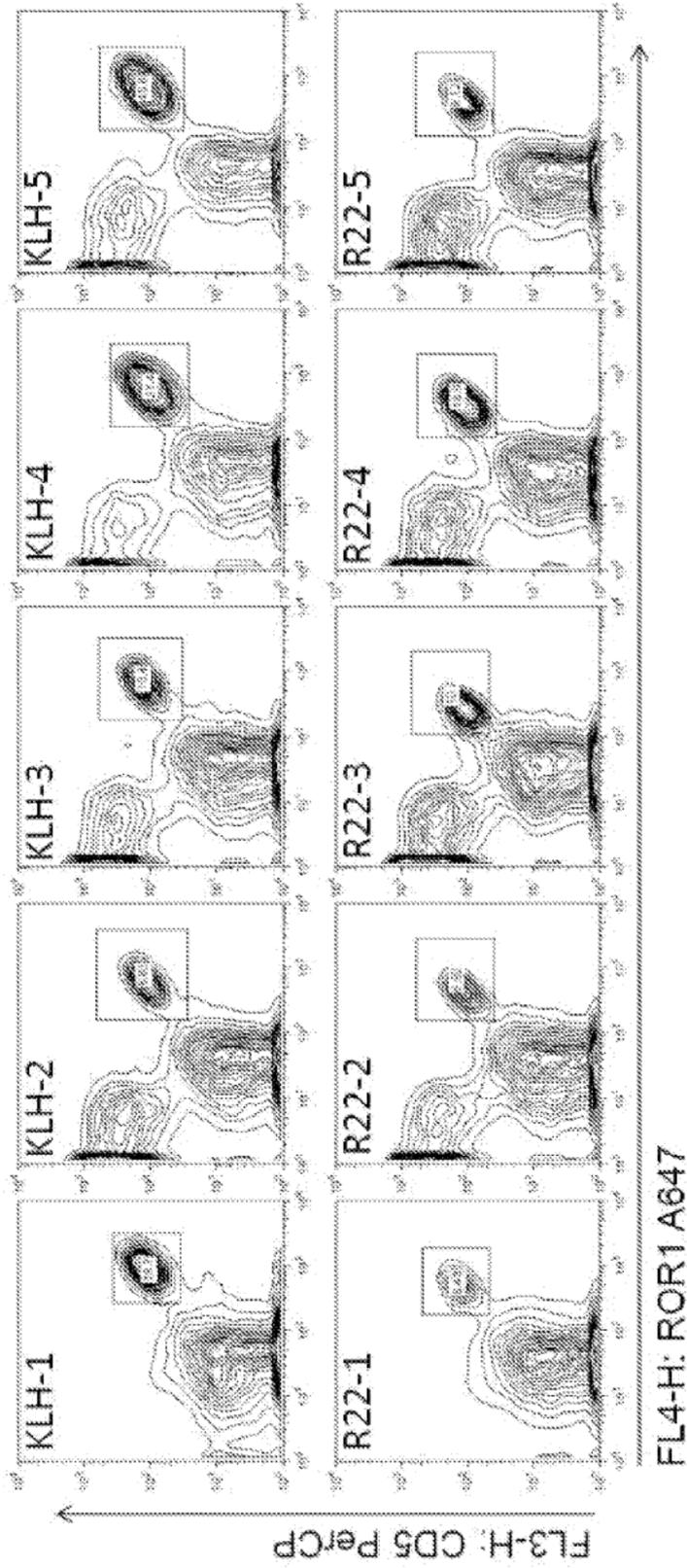


FIG. 39

Inhibición de injerto de leucemia ROR1+ por vacunación con R22 de ratones ROR1-Tg

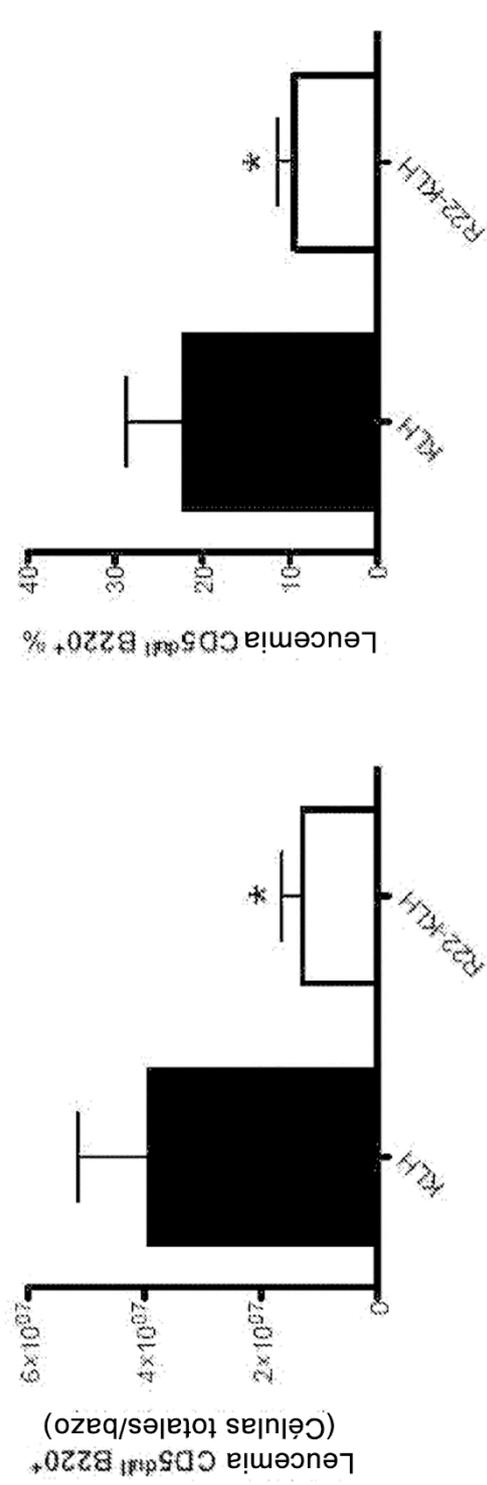


FIG. 40

Disminución de ROR1 en ratones ROR1-Tg inmunizados con R22

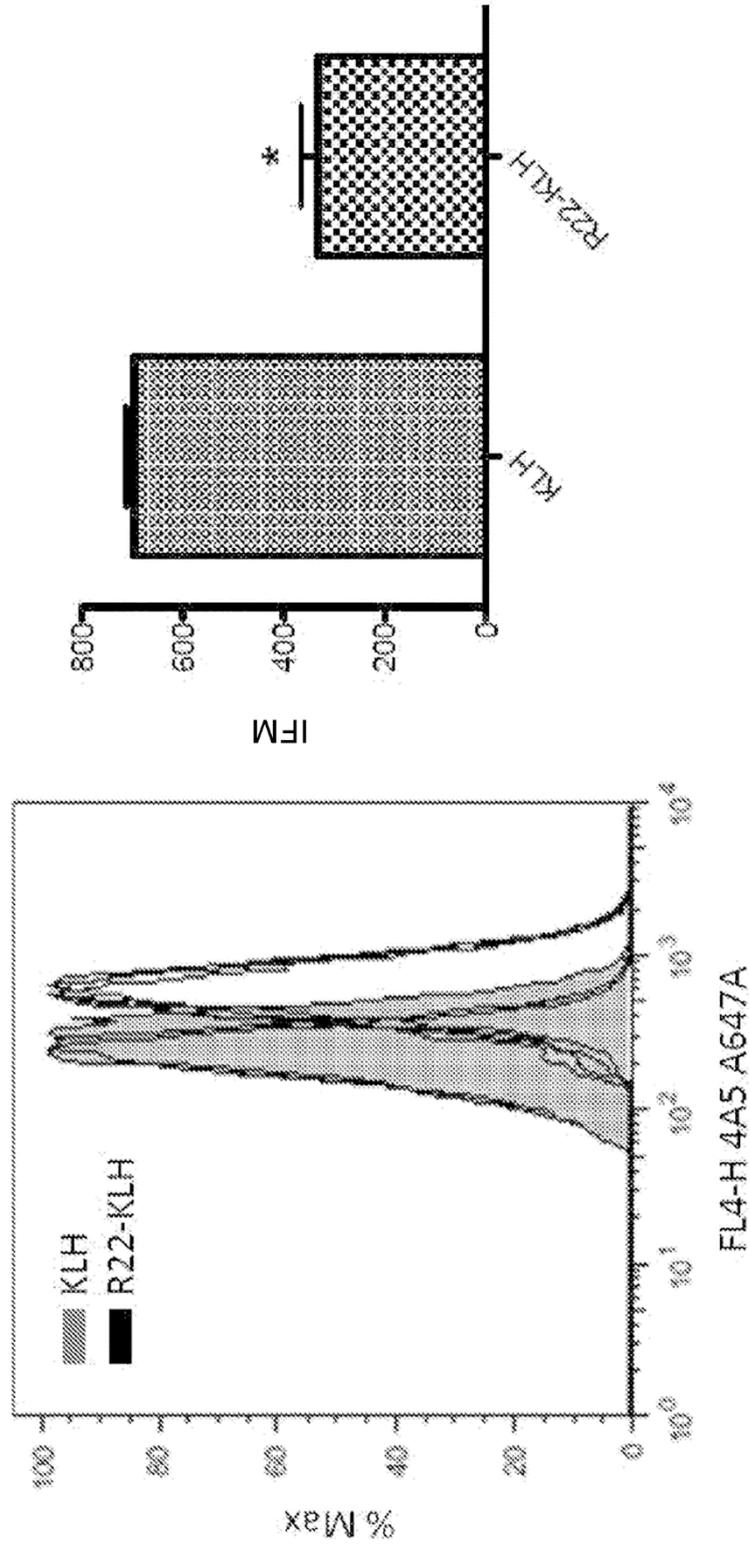


FIG. 41

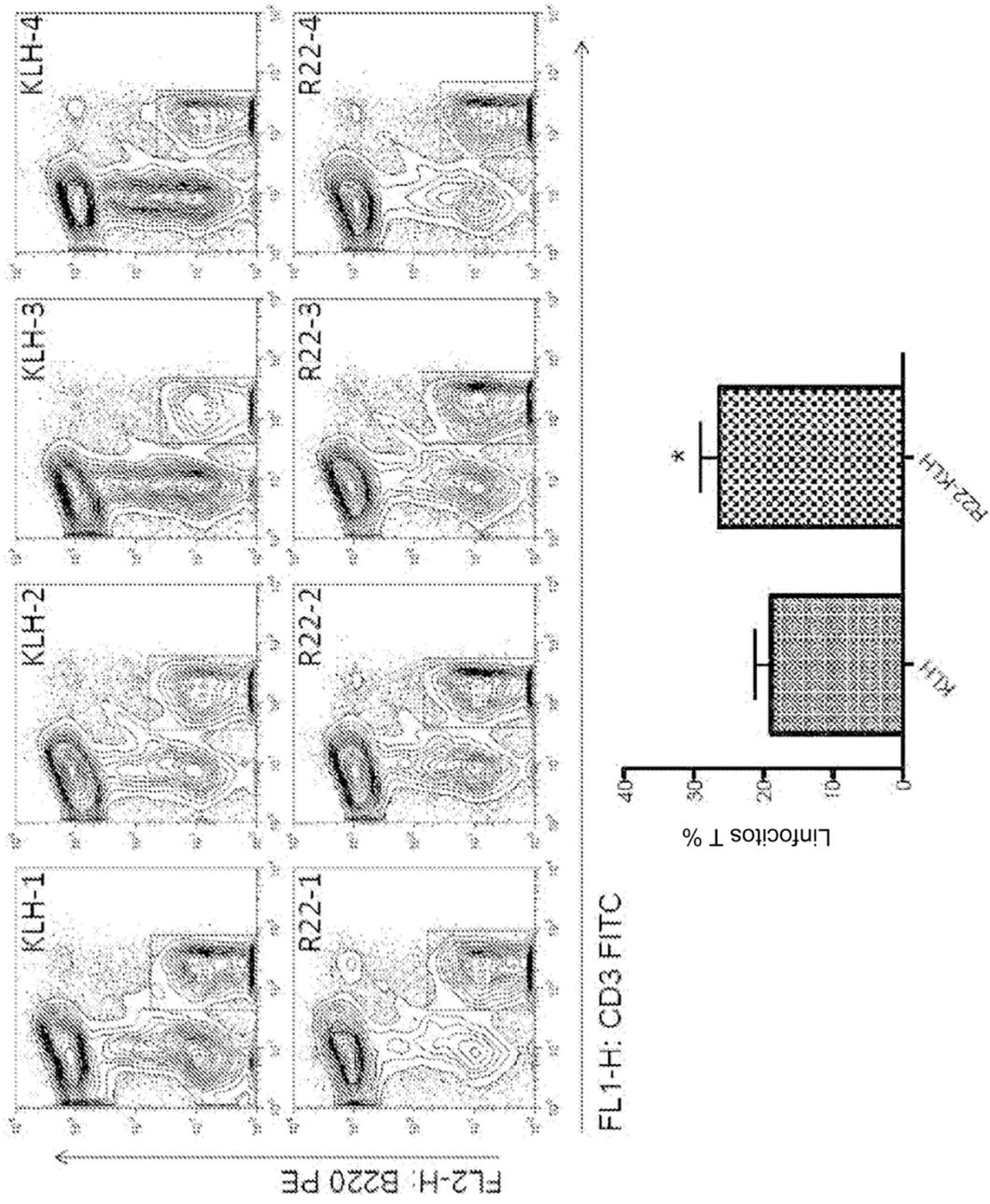


FIG. 42

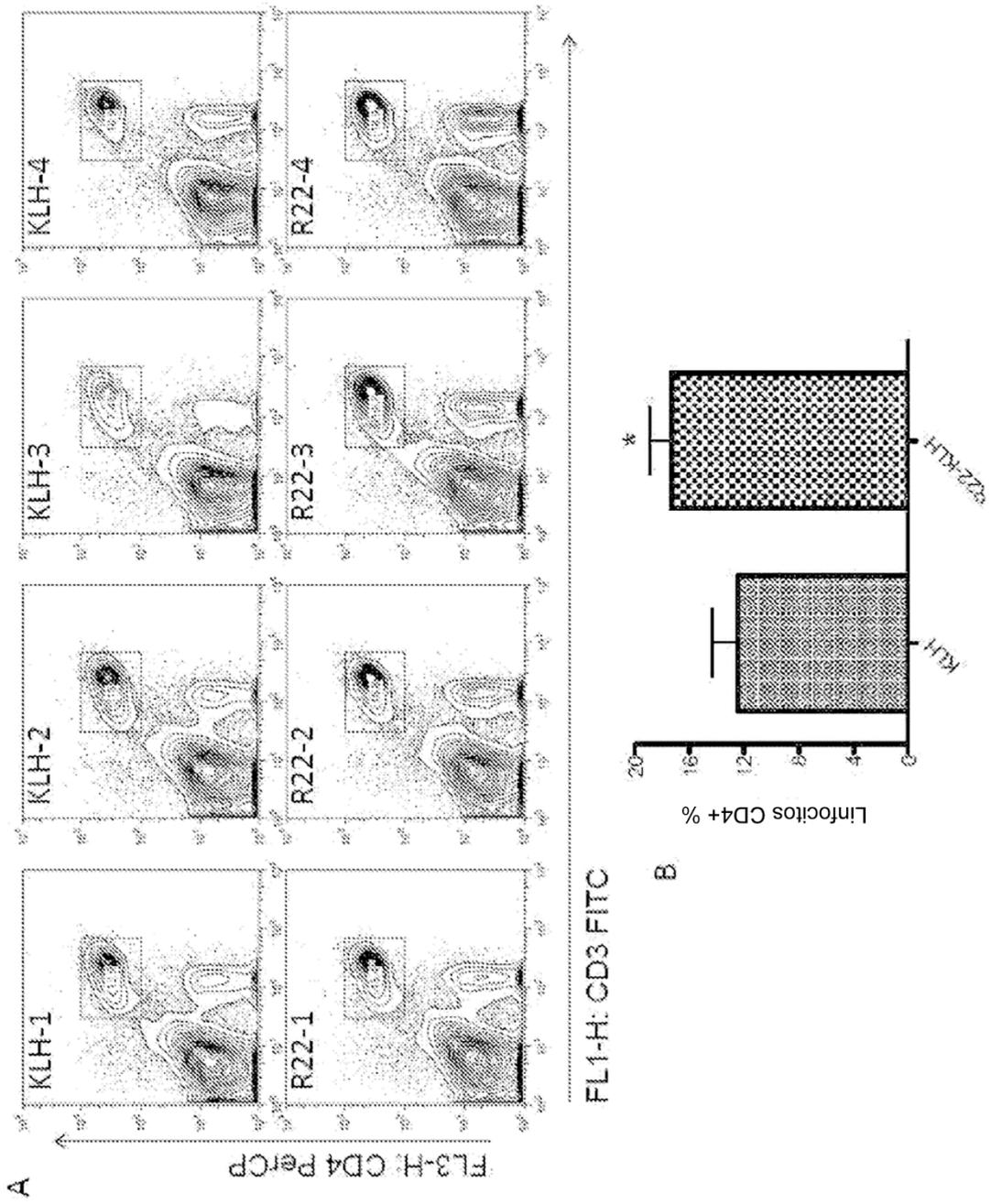


FIG. 43

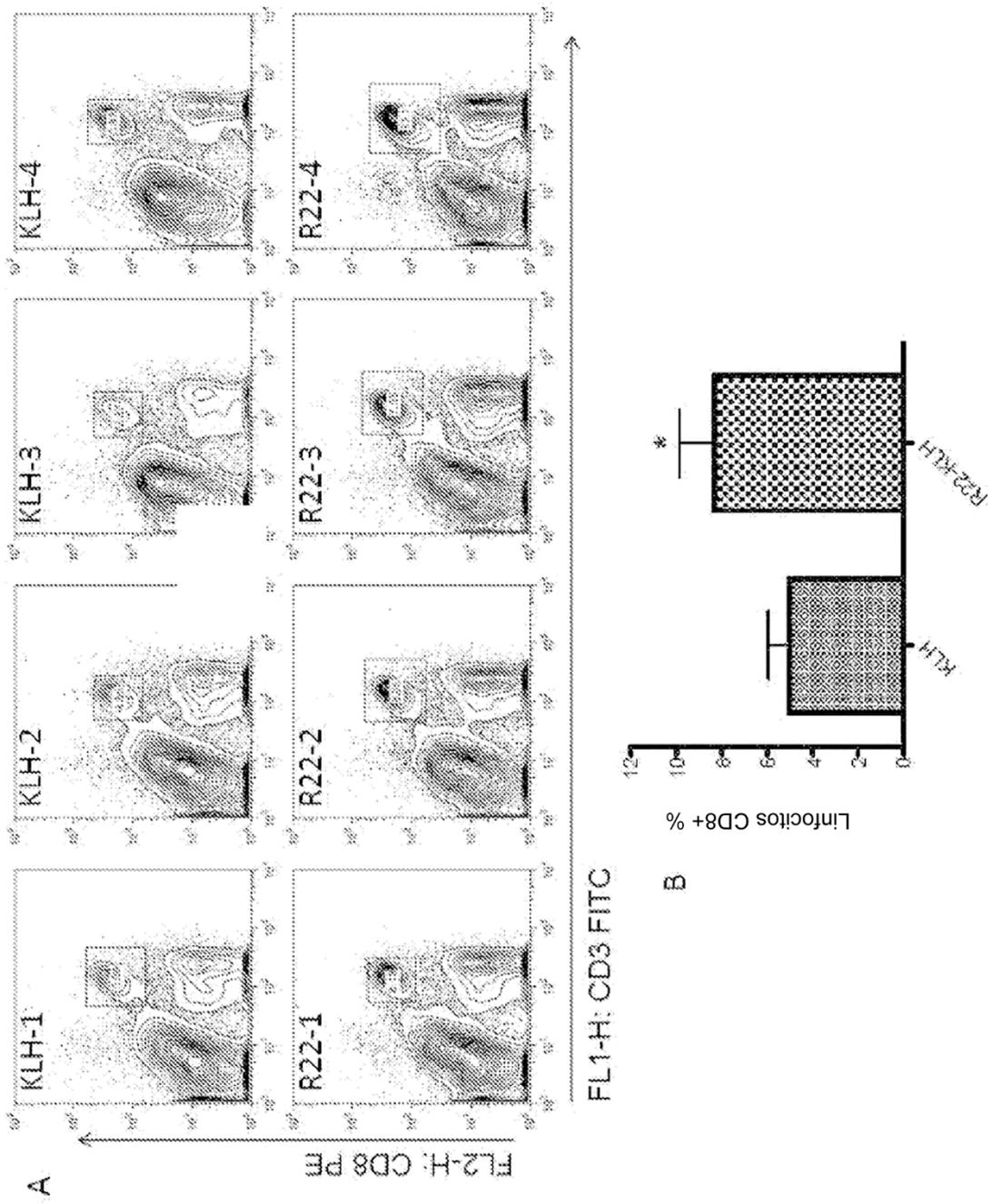


FIG. 44

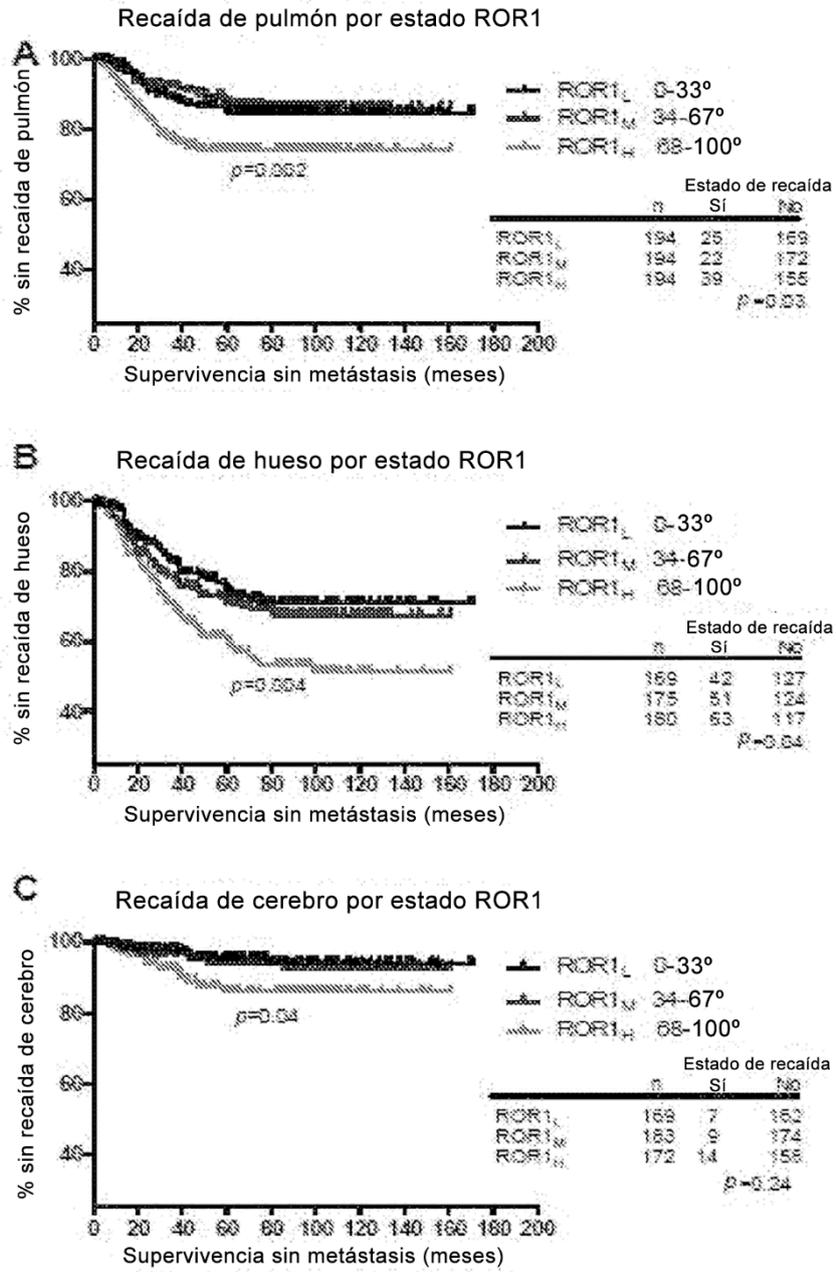


FIG. 45

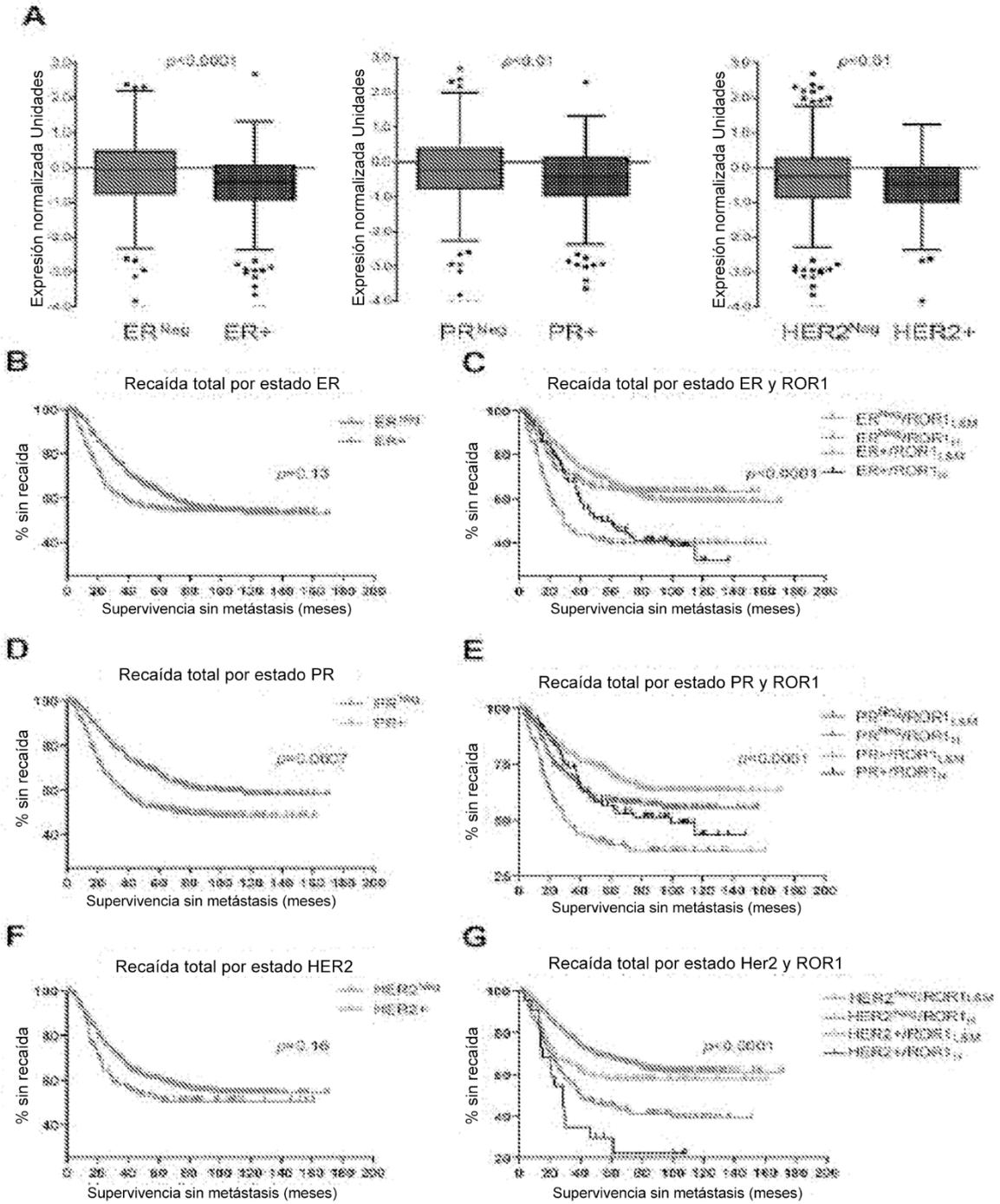


FIG. 46

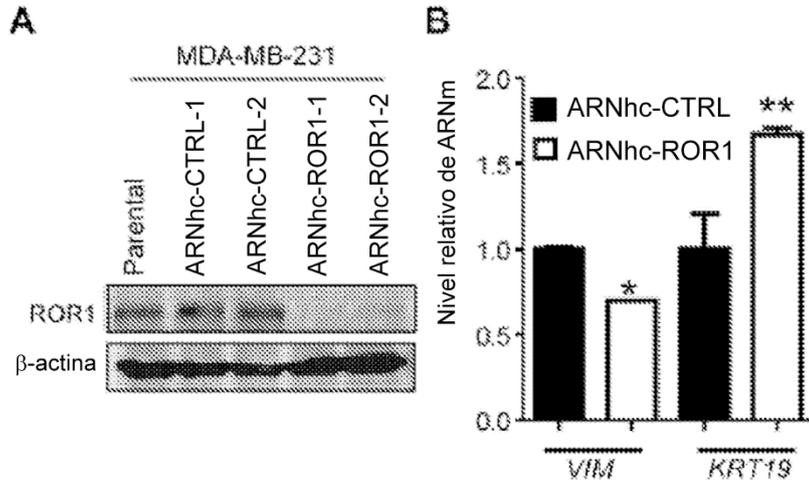


FIG. 47

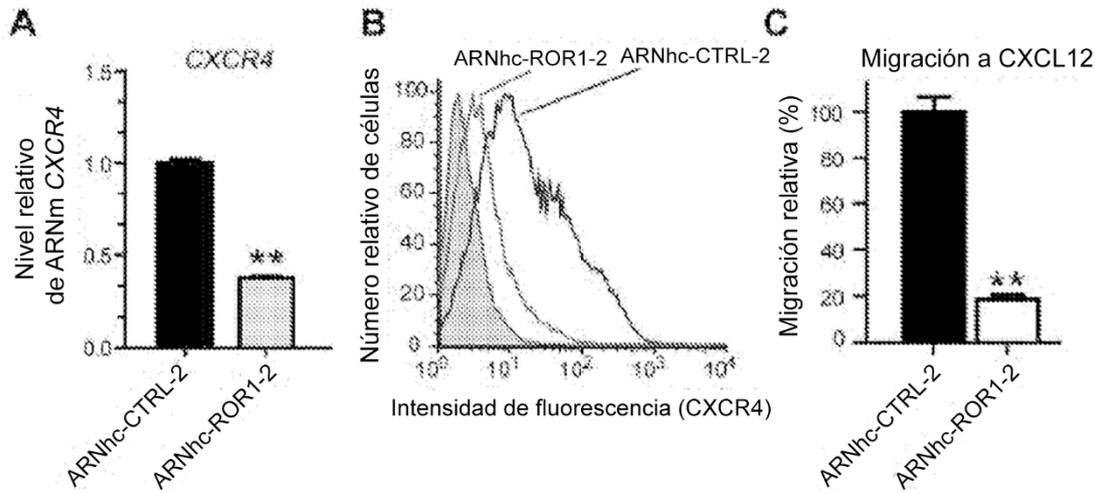


FIG. 48

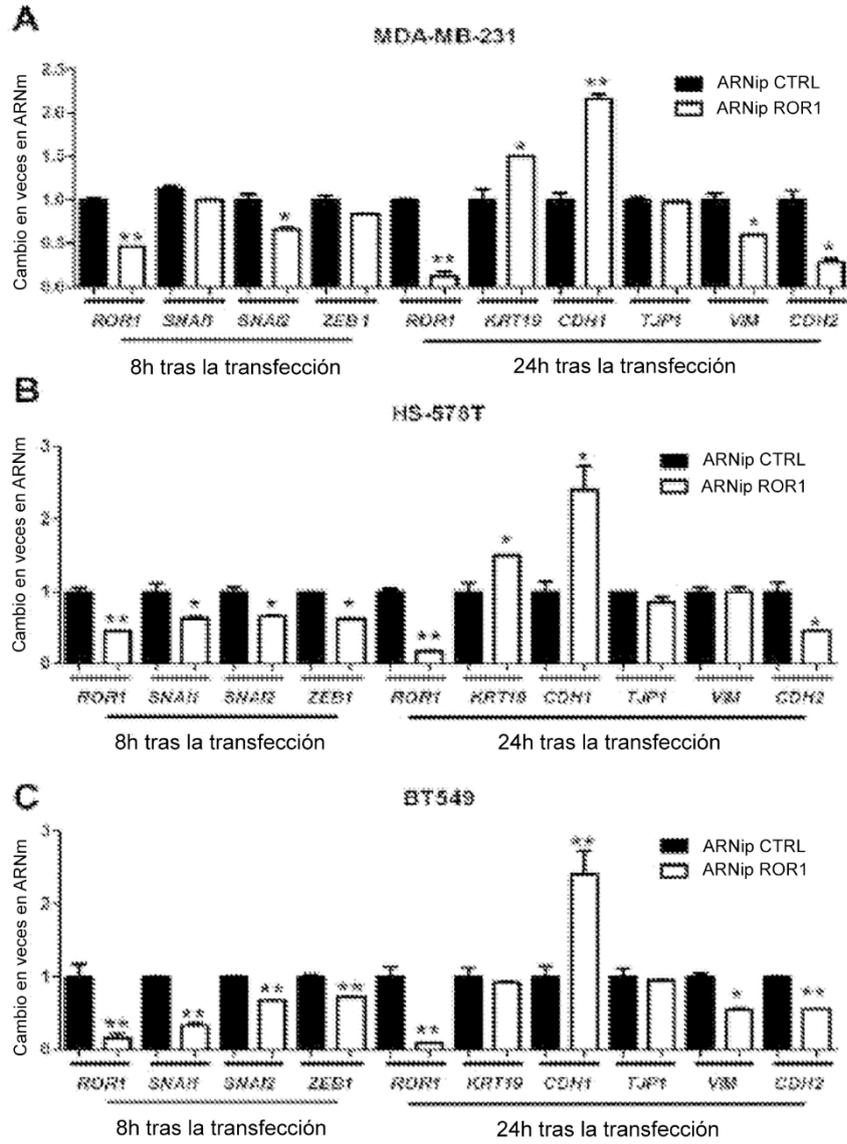


FIG. 49

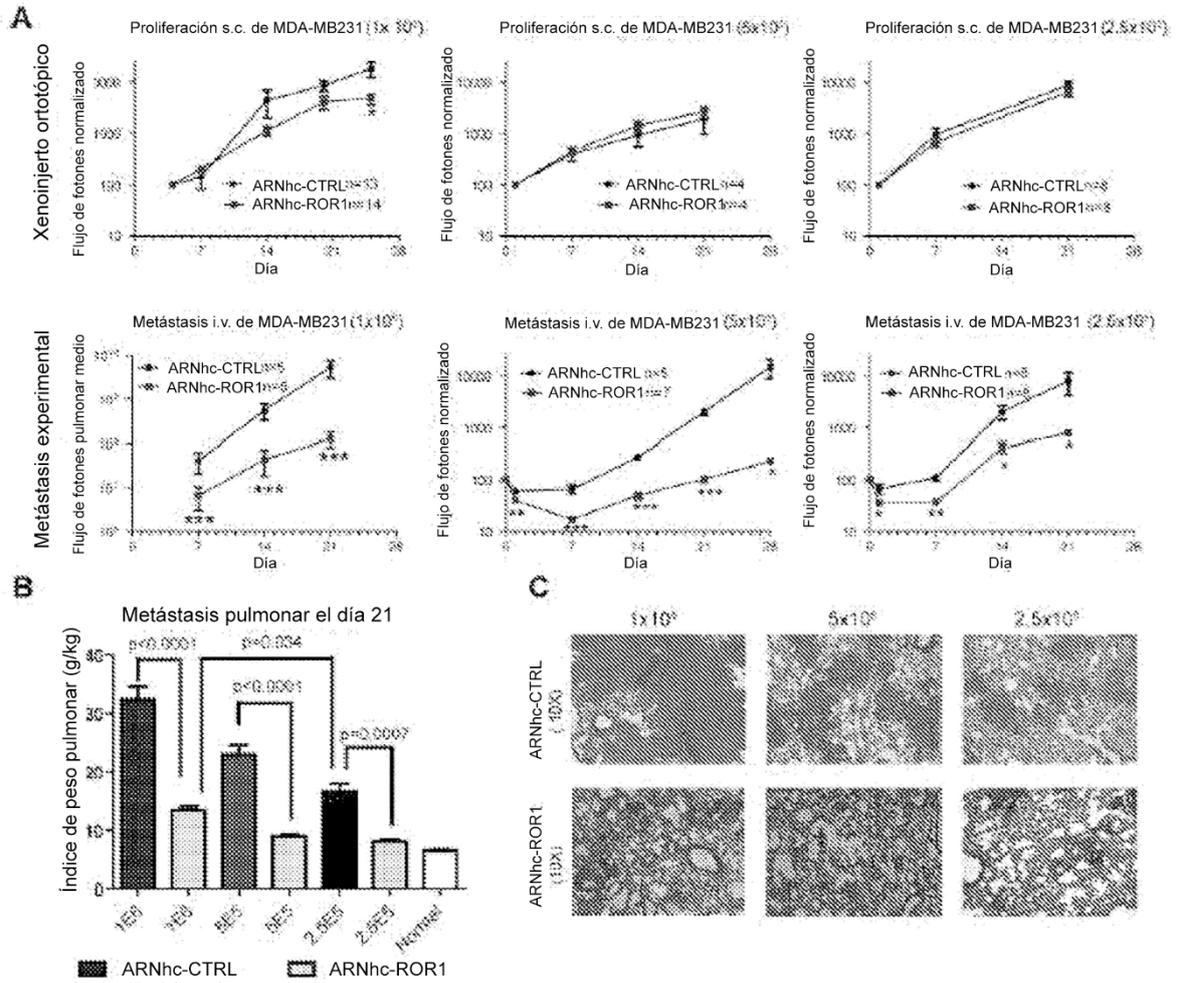


FIG. 50

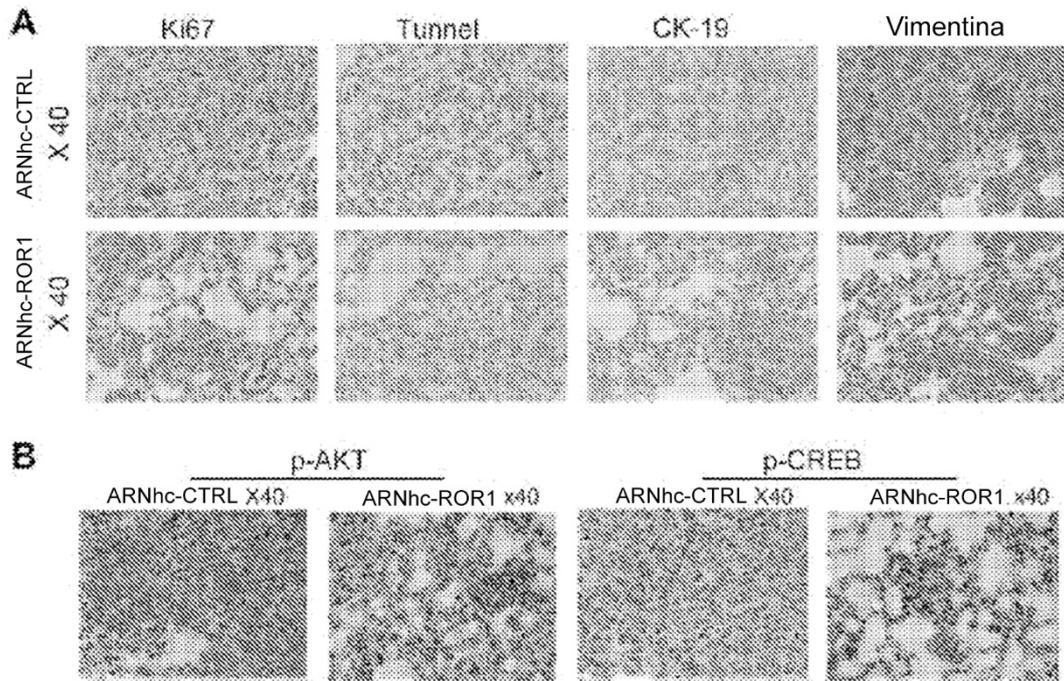


FIG. 51

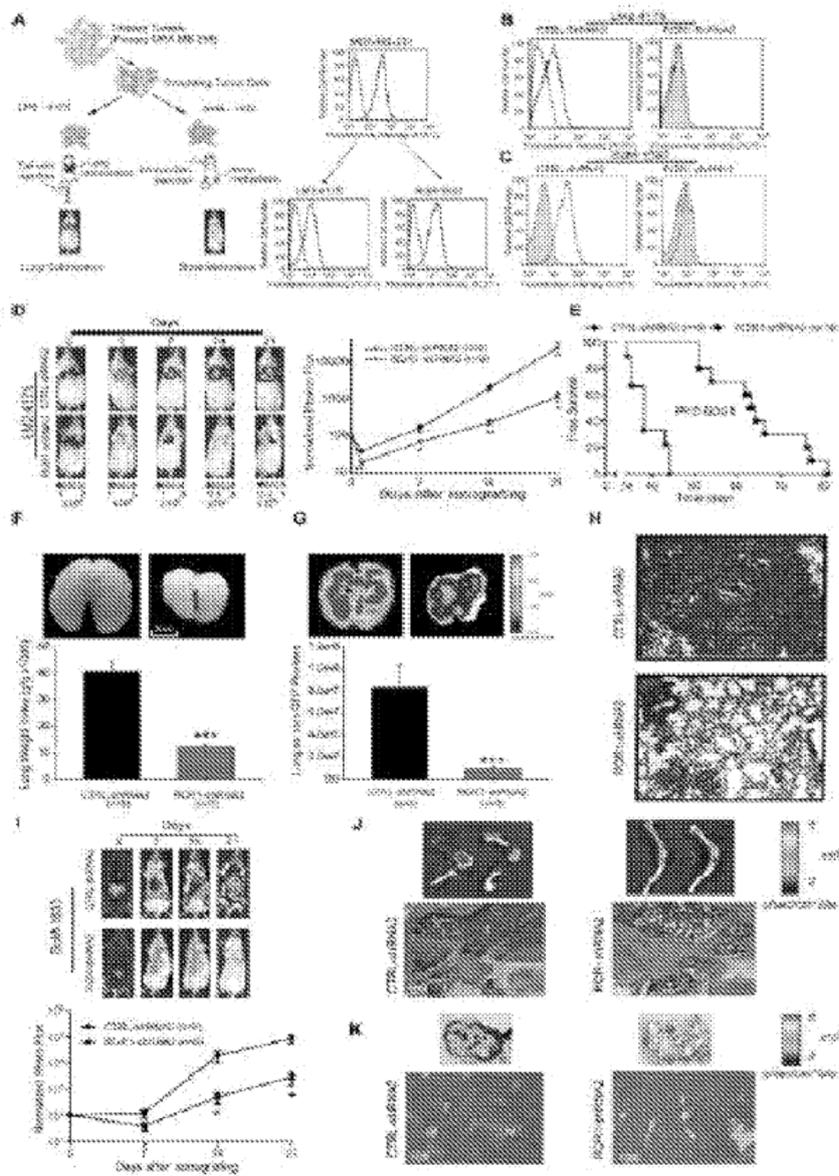


FIG. 52

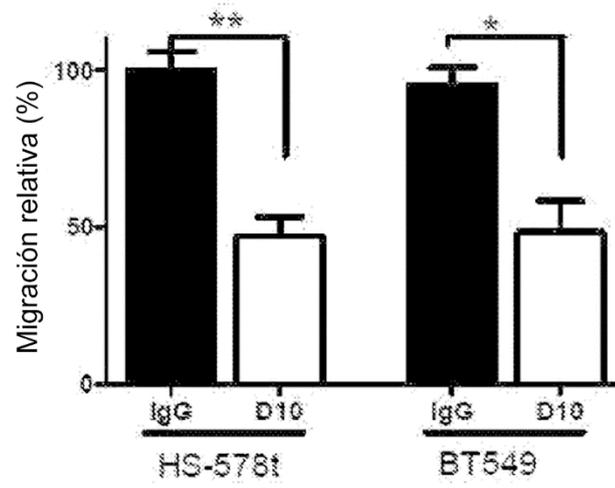


FIG. 53