

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 339**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2014 PCT/EP2014/057199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14167022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014 E 14715967 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2984107**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos contra CD3ε y ROR1**

30 Prioridad:

09.04.2013 EP 13001840

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

16.03.2020

73 Titular/es:

**ENGMAB SÀRL (100.0%)
route de Perreux 1
2017 Boudry, CH**

72 Inventor/es:

**VU, MINH DIEM;
STREIN, KLAUS;
MOESSNER, EKKEHARD;
HOSSE, RALF;
AST, OLIVER;
FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER, ANNE;
FAUTI, TANJA;
MURR, RAMONA;
KLEIN, CHRISTIAN;
UMANA, PABLO y
MOSER, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 748 339 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 biespecíficos contra CD3 ϵ y ROR1

- 5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos biespecíficos contra CD3 ϵ y ROR1, su fabricación y uso.

Antecedentes de la invención

10 ROR1 (sinónimos: receptor transmembrana de proteína tirosina quinasa ROR1, EC=2.7.10.1, tirosina quinasa neurotrófica, receptor relacionado 1, UniPrkB Q01973) es un receptor de proteína tirosina quinasa. El receptor se describe en Masiakowski P., Carroll RD, J. Biol. Chem. 267: 26181-26190 (1992) "A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain". WO9218149 y WO9527060 mencionan ROR-1 como RTK-2 y anticuerpos contra ROR-1. WO2002087618 menciona un procedimiento para controlar el crecimiento y la diferenciación del cáncer mediante la inhibición selectiva de un receptor de factor de crecimiento. Dicho receptor sería Ror1 o Ror2. WO2005100605 menciona ROR1 como una diana terapéutica para el cáncer de mama y anticuerpos anti ROR1 que se unen específicamente a ROR1, a la región extracelular de ROR1 (M1-V406) y fragmentos de ROR1 Q73-V139, E165-I299, K312-C391. WO2007051077 se refiere a un anticuerpo anti-ROR1 y su uso en la detección de células de linfoma. WO2008103849 también menciona anticuerpos anti-ROR1. Rabbani (Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2010 116: Abstract 916) describe el uso de anticuerpos anti ROR1 para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL). Rabbani utilizó un anticuerpo anti-ROR1 contra el dominio extracelular, un anticuerpo contra la región CRD (sitio de unión ligando para proteínas Wnt) y un anticuerpo contra el dominio kringle. Daneshmanesh AH et al., Int. J. Cancer, 123 (2008) 1190-1195 se refiere a un anticuerpo anti ROR1 que se une al fragmento del dominio extracelular WNISSELNKDSYLTL (SEQ ID NO: 18) y un anticuerpo anti ROR1 que se une al fragmento del dominio intracelular KSQKPYKIDSKQAS (SEQ ID NO: 20). También se menciona el uso de dichos anticuerpos para el tratamiento de CLL.

25 WO2011159847 se refiere a un anticuerpo anti-ROR1 como un conjugado con una molécula biológicamente activa para el tratamiento de cáncer con ROR1 como linfoma o adenocarcinoma. WO2008076868, WO2008103849, WO201008069, WO2010124188, WO2011079902, WO2011054007, WO2011159847, WO2012076066, WO2012076727, WO 2012045085 y WO2012097313 se refieren también a moléculas de unión a ROR1 o anticuerpos anti ROR1. WO2012075158 se refiere a un anticuerpo anti-ROR1 que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) la secuencia de SEQ ID NO: 2 y como dominio variable de cadena pesada (VH) la secuencia de SEQ ID NO: 6, y como respectivas CDRs las secuencias de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 7, 8, 9.

30 WO2005040413 se refiere a un procedimiento de cribado para la identificación y/o validación de inhibidores de un receptor de actividad de tirosina quinasa, incluyendo ROR1.

35 WO2008036449, WO2011014659 y WO2011050262 mencionan anticuerpos biespecíficos en los que una diana puede ser ROR1. WO2007146968 menciona proteínas de unión de cadena única multivalentes con función efectora y ROR1 y CD3 se mencionan como posibles diana. WO2011054007 se refiere a un procedimiento de tratamiento de cáncer que administra un reactivo de afinidad que se une al dominio extracelular de ROR1. También se mencionan anticuerpos biespecíficos con CD3. WO2014031174 menciona anticuerpos biespecíficos que son específicos a dos epítomos diferentes de ROR1. El anticuerpo preferido D10 internaliza fuertemente a 37 °C en adenocarcinoma de mama epitelial MDA MB 231. Yang y Baskar PLoS ONE 6 (2011) e21018, como WO2012075158, mencionan también el anticuerpo anti-ROR1 R12. Rebagay R. et al., Frontiers in Oncology (2012) 7, Artículo 34, 1-8 mencionan que ROR son dianas farmacéuticas y un medio para suministrar agentes citotóxicos en las células que expresan la diana en la superficie celular. Rebagay también menciona anticuerpos biespecíficos, tales como BiTE. La fuerte internalización es favorable para los anticuerpos armados, es decir, conjugados de fármacos y anticuerpos de acuerdo con Rebagay. D. MEZZANZANICA ET AL, International Journal of Cancer, 41 (1988) 609-615 investigaron un enfoque terapéutico mediante el reconocimiento de CTL por un anticuerpo biespecífico que consiste en MOv18 (un anticuerpo que se internaliza mal específico para las células de carcinoma de ovario humano) y un anticuerpo anti-CD3 (OKT3 o TR66). M. HUDECEK ET AL., BLOOD, 116 (2010), 4532-4541, mencionan que ROR1 se expresa por la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y linfoma de células del manto (MCL). Tales células pueden ser reconocidas por células T CD8⁺ activadas transfectadas con, y que expresan scFv de anticuerpo murino anti-ROR1 2A2. Tales células son útiles para el tratamiento de tumores malignos de células B. Baskar S. et al, mAbs. 4: 3 (2012) 349-361 se refieren al reconocimiento de células B malignas con una inmunotoxina BT-1 que comprende scFv anti-ROR1 2A2 conjugado con toxina PE38. La inmunotoxina está parcialmente internalizado e induce la apoptosis.

40 El complejo TCR/CD3 de los linfocitos T consiste en heterodímero TCR alfa (α)/beta (β) o TCR gamma (γ)/delta (δ) coexpresado en la superficie celular con las subunidades invariables de gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ), zeta (ζ), y eta (η) marcados con CD3. CD3 ϵ humano se describe en UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Un anticuerpo anti CD3 ϵ que se describe en el estado de la técnica es SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137: 1097-1100). SP34 reacciona con CD3 de primate y humano. SP34 está disponible de Pharmingen. Un anticuerpo anti CD3 adicional que se describe en el estado de la técnica es UCHT-1 (véase WO2000041474). Un anticuerpo anti CD3 adicional que se describe en el estado de la técnica es BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute, que se utiliza en los ensayos de Fase I/II de GvHD, Anasetti et al, Transplantation 54: 844 (1992)). SP34 difiere de UCHT-1

y BC-3 en que SP34 reconoce un epítipo presente en únicamente la cadena ϵ de CD3 (ver Salmeron et al, (1991) J. Immunol 147:... 3047), mientras que UCHT-1 y BC-3 reconocen un epítipo contribuido tanto por las cadenas ϵ y γ . Un anticuerpo con la misma secuencia que el anticuerpo SP34 se menciona en WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 y WO2010037838. VH de anticuerpo que es 96% idéntico a VH de anticuerpo SP34 se menciona en US8236308 (WO2007042261).

Una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes se han desarrollado en el pasado reciente, por ejemplo, por fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (véase Kontermann RE, mAbs 4: 2, (2012) 1-16). Los anticuerpos biespecíficos en los que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 o VL y VH se sustituyen entre sí se describen en WO2009080252 y WO2009080253.

Un enfoque para diseñar homodímeros de cadena pesada de anticuerpo para la heterodimerización que se conoce como "knob-into-holes", tiene por objeto forzar el apareamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 de modificar la interfaz de contacto. (Ridgway JB, Presta LG, Carter P; y WO1996027011, Merchant AM, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Arwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35). Nuevos enfoques para la tecnología de "knob-into-holes" se describen en, por ejemplo, el documento EP 1870459A1. Xie, Z., et al, J Immunol Methods 286 (2005) 95-101 se refiere a un formato de anticuerpo biespecífico utilizando scFv en combinación con la tecnología de "knob-into-holes" para la parte FC. WO 2012116927 y WO 2010/145792 mencionan el intercambio de los dominios CH1 y CL. WO 2009/080254 menciona construcciones de "knob-into-holes" para producir anticuerpos biespecíficos.

WO2013026831 proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífico, que comprende un primer fragmento Fab que se une específicamente a un primer antígeno, un segundo fragmento Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y un dominio Fc. WO2013026833 proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífico que activa células T que comprende un resto de unión a un primer y un segundo antígeno, uno de los cuales es una molécula Fab capaz de unirse a un antígeno activante de células T y el otro de los cuales es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, y un dominio Fc. WO2013026835 se refiere a anticuerpos biespecíficos que comprenden al menos dos fragmentos Fab, en el que el primer fragmento Fab comprende al menos un sitio de unión a antígeno específico para un primer antígeno; y el segundo fragmento Fab comprende al menos un sitio de unión a antígeno específico para un segundo antígeno, en el que las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera del segundo Fab se intercambian; y en el que el anticuerpo biespecífico está desprovisto de un dominio Fc. Dicho anticuerpo puede comprender adicionalmente un tercer fragmento Fab. Dicho tercer fragmento Fab puede comprender al menos un sitio de unión a antígeno específico para el primero o segundo antígeno, preferiblemente para el primer antígeno. WO2013026837 proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífico que activa células T que comprende una primera y una segunda molécula Fv de cadena sencilla (scFv) fusionadas entre sí, en la que la primera molécula scFv es capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y la segunda molécula scFv es capaz de unirse específicamente a un antígeno activante de células T; caracterizada porque la molécula de unión a antígeno biespecífico que activa células T que comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociación estable.

WO2013026839 se refiere a anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a un antígeno activador de células T y un antígeno tumoral (TA), que comprende un primer fragmento Fab y un segundo fragmento Fab, en el que las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera del segundo Fab se intercambian; y en el que el anticuerpo biespecífico no comprende un dominio Fc. En un aspecto de WO2013026839, se da a conocer un anticuerpo biespecífico que se une específicamente un antígeno activador de células T y un Antígeno Tumoral (TA), que comprende al menos dos fragmentos Fab, en el que el primer fragmento Fab comprende al menos un sitio de unión a antígeno específico para un antígeno tumoral (TA); y el segundo fragmento Fab comprende al menos un sitio de unión a antígeno específico para un antígeno activador de células T, en el que las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera del segundo Fab se intercambian; y en el que el anticuerpo biespecífico está desprovisto de un dominio Fc. WO2013026839 se refiere también a los anticuerpos biespecíficos en los que el antígeno activador de células T es un antígeno que reconoce el correceptor de células T CD3 (CD3). En una realización, el primer y segundo fragmentos Fab están conectados a través de un enlazador peptídico. Preferiblemente, dicho péptido enlazador es un enlazador (G4S)₂.

Características de la invención

Basándose en la descripción que está contenida en el presente documento, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas humanas CD3 ϵ y el dominio extracelular de ROR1 humano (ROR1), en el que el anticuerpo biespecífico tiene el constructo Fab de ROR1 - Fc – Fab de CD3 – Fab de ROR1.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación del anticuerpo biespecífico de la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende moléculas de ácido

nucleico que codifican el anticuerpo de la invención.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica de la invención para uso como medicamento.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica de la invención para usar como un medicamento en el tratamiento de un tumor maligno hematológico positivo de ROR1, un tumor sólido positivo de ROR1, leucemia linfocítica crónica de linaje de células B (B-CLL) o un trastorno de las células de plasma.

15 La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas humanas CD3_ε (denominada además también como "CD3") y el dominio extracelular de ROR1 humano (denominada además también como "ROR1"). La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas humanas CD3_ε y el dominio extracelular de ROR1 humano que no se internaliza. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza preferiblemente en que no se internaliza en una concentración de 1 nM en células primarias de B-CLL a 37 °C durante dos horas. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza preferiblemente porque el anticuerpo biespecífico no se internaliza en un ensayo basado en células a 37 °C durante 2 horas, utilizando células primarias de B-CLL positivas de ROR1 y utilizadas en una concentración de anticuerpo de 1 nM, en el que no internalizar significa que la intensidad de fluorescencia media (MFI), detectada mediante citometría de flujo, de un anticuerpo biespecífico tras la unión a las células primarias de B-CLL positivas de ROR1 medida en el tiempo 0 no se reduce más del 50%, preferiblemente no más de un 30% cuando se vuelve a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C.

30 Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la descripción se caracteriza en que consiste en un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 (Fab de CD3), uno o dos fragmentos Fab de un anticuerpo anti-ROR1 (Fab de ROR1) y ningún o un fragmento Fc. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la descripción se caracteriza en que comprende un anticuerpo anti-ROR1 monovalente que se une específicamente a ROR1, y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la descripción se caracteriza en que es bivalente y que comprende un anticuerpo anti-ROR1 monovalente que se une específicamente a ROR1, y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza en que es trivalente y que comprende un anticuerpo anti-ROR1 bivalente que se une específicamente a ROR1, y un fragmento Fab monovalente de un anticuerpo que se une específicamente a CD3

40 Preferiblemente, en la cadena ligera y cadena pesada del Fab de CD3 los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen entre sí (CD3 crossFab). El Fab de CD3 está unido en N-terminal al extremo C-terminal del Fab de ROR1. Preferiblemente, el dominio VH del Fab de CD3 está unido en N-terminal al extremo C-terminal del dominio CH1 del Fab de ROR1. La parte Fc está unida a través de su región bisagra al extremo C-terminal de la respectiva Fab.

45 Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la invención se selecciona de entre el grupo de construcciones
 a) Fab de CD3 – Fab de ROR1,
 b) Fab de CD3 – Fab de ROR1 – Fab de ROR1
 c) Fc – Fab de CD3 – Fab de ROR1 y
 d) Fab de ROR1 - Fc – Fab de CD3 – Fab de ROR1.

50 Las construcciones preferidas comprenden como Fab de CD3 CD3 crossFab. Los dos Fab de ROR1 de las construcciones b) y d) se derivan del mismo anticuerpo anti-ROR1 y comprenden al menos las mismas CDR o los mismos dominios VH, VL, CH1 y CL.

55 Los anticuerpos biespecíficos preferidos se muestran en la Figura 1.

Las construcciones se componen de los bloques de construcción de la SEQ ID NO: 29 a 36. La descripción, por tanto, comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, y 36, los respectivos ácidos nucleicos y su uso para la preparación de las construcciones.

60 La descripción se refiere además a una construcción seleccionada del grupo de
 a) construcción que consiste en bloques de construcción de SEQ ID NO: 30 (2x), 31, 32, y 33 (Fig. 1.1)
 b) construcción que consiste en bloques de construcción de SEQ ID NO: 30, 31, 33, y 36 (Fig. 1.2)

65 c) construcción que consiste en bloques de construcción de SEQ ID NO: 30 (2x), 33, y 35 (Fig. 1.3)

d) construcción que consiste en bloques de construcción de SEQ ID NO: 30, 33, y 34 (Fig. 1.4)

En una realización adicional, las secuencias de mAb CD3 (VH y/o VL) dentro de las SEQ ID NO: 31, 33, 34, 35 se sustituyen por las respectivas secuencias de VH y/o VL de SEQ ID NO: 10 y 11.

La presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3 ϵ humanas (denominadas además también como "CD3") y el dominio extracelular de ROR1 humano (denominada además también como "ROR1"), caracterizado porque el anticuerpo biespecífico no se internaliza en un ensayo basado en células a 37 °C durante 2 horas, utilizando células primarias de B-CLL positivas de ROR1 y utilizadas en una concentración de anticuerpo de 1 nM, en el que no internalizar significa que la intensidad de fluorescencia media (MFI), detectada mediante citometría de flujo, de un anticuerpo biespecífico tras la unión a las células primarias de B-CLL positivas de ROR1 medida en el tiempo 0 no se reduce más del 50%, preferiblemente no más de un 30% cuando se vuelve a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3 ϵ humanas (denominadas además también como "CD3") y el dominio extracelular de ROR1 humano (denominada además también como "ROR1"), caracterizado porque el anticuerpo biespecífico no se internaliza en un ensayo basado en células a 37 °C durante 2 horas, utilizando la línea celular de B-CLL EHEB DSMZ ACC-67, y utilizadas en una concentración de anticuerpo de 1 nM, en el que no internalizar significa que la intensidad de fluorescencia media (MFI), detectada mediante citometría de flujo, de un anticuerpo biespecífico tras la unión a las células primarias de B-CLL positivas de ROR1 medida en el tiempo 0 no se reduce más del 50%, preferiblemente no más de un 30% cuando se vuelve a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C.

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la invención está desprovisto de un dominio Fc. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención comprende un dominio Fc.

Alternativamente, el anticuerpo biespecífico puede comprender en lugar de las cadenas individuales de Fab que consisten en los mismos dominios. En tal caso los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 no se sustituyen entre sí.

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la invención es un anticuerpo bivalente y se caracteriza en que comprende un anticuerpo anti-ROR1 monovalente que se une específicamente a ROR1 y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3. Un anticuerpo bivalente es preferente si dicha intensidad de fluorescencia media (MFI), tal como se detecta mediante citometría de flujo, tras la unión a células positivas de ROR1 medida a tiempo 0 no se reduce más de 50%, preferiblemente no más de 30% en la internalización cuando se vuelve a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la invención es un anticuerpo bivalente y se caracteriza en que comprende un anticuerpo monovalente anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1, y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3. Preferiblemente, el anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3 es un fragmento Fab, preferiblemente un CD3 crossFab. Dicho anticuerpo bivalente es preferente si dicha intensidad de fluorescencia media (MFI), tal como se detecta mediante citometría de flujo, tras la unión a células positivas de ROR1, medida a tiempo 0 no se reduce más de 50%, preferiblemente no más de 30% en la internalización cuando se vuelve a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es un anticuerpo trivalente y caracterizado porque comprende un anticuerpo anti-ROR1 bivalente que se une específicamente a ROR1, y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3. Preferiblemente, el anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3 es un fragmento Fab o preferiblemente un crossFab CD3. Un anticuerpo trivalente es preferente si dicha intensidad de fluorescencia media (MFI), tal como se detecta mediante citometría de flujo, tras la unión a células positivas de ROR1, medida a tiempo 0 no se reduce más de 50%, preferiblemente no más de 30% en la internalización cuando se vuelve a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C.

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza en que el anticuerpo biespecífico no se internaliza en dicho ensayo basado en células a 37 °C durante 24 horas.

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la invención no se internaliza en dicho ensayo basado en células si se utiliza en una concentración de entre 0,1 y 200 nM.

Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con esta invención con una relación de afinidad de ROR1 a CD3 de 5000:1 a 5:1, según se determina por los valores de Kd usando resonancia de plasmón superficial. Dicho anticuerpo es favorable debido a su unión más fuerte a las células malignas sobre células T. Preferiblemente, los valores de Kd son aproximadamente 100 nM para el anticuerpo CD3 y aproximadamente de 50 pM a 50 nM para el anticuerpo ROR1.

La presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3 ϵ humanas (denominadas además también como "CD3") y el dominio extracelular de ROR1 humano (denominado además también como "ROR1"), caracterizado porque

- i) dicho anticuerpo biespecífico es una proteína de fusión de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 unido químicamente en su extremo N-terminal al C-terminal de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-ROR1 y
- ii) los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 del anticuerpo anti-CD3 se sustituyen entre sí.

5 Preferiblemente, el dominio VH del Fab de CD3 está unido al dominio CH1 del Fab de ROR1. Preferiblemente, el dominio VL del Fab de CD3 Fab está unido al dominio CL de dicho Fab anti-ROR1.

Los fragmentos Fab se unen químicamente entre sí mediante el uso de un enlazador apropiado de acuerdo con el estado de la técnica. Preferiblemente se utiliza un enlazador (Gly4-Ser1) 2 enlazador (doble enlazador de Gly-Ser, SEQ ID NO: 19) o se utiliza un triple enlazador Gly-Ser (Desplancq DK et al, Protein Eng 1994 Agosto; 7 (8): 1027-33 y Mack M. et al., PNAS 18 de julio 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025).

10 Preferiblemente, las células de B-CLL se usan de acuerdo con la invención en una concentración celular de 15×10^6 células/ml (PBMC primarias de pacientes con CLL) o 2×10^6 células/ml (ACC-67).

15 Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza además porque se une también específicamente a ROR1 de mono cynomolgus.

20 Un ejemplo adicional de la descripción es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3 ϵ humanas (denominadas además también como "CD3") y el dominio extracelular de ROR1 humana (denominado además también como "ROR1"), caracterizado porque comprende un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a una de dichas dianas y un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a la otra de dichas dianas.

25 Un ejemplo adicional de la descripción es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3 ϵ humanas (denominadas además también como "CD3") y el dominio extracelular de ROR1 humana (denominado además también como "ROR1"), caracterizado porque comprende un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a una de dichas dianas y dos fragmentos Fab de un anticuerpo que se unen específicamente a la otra uno de dichas dianas.

30 Preferiblemente, la porción de anticuerpo se une específicamente a CD3 humano (H2C) se caracteriza en que comprende un dominio VH de cadena pesada variable que comprende las CDR de SEQ ID NO: 12, 13 y 14, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y un dominio VL variable que comprende las CDR de SEQ ID NO: 15, 16 y 17, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera. Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano se caracteriza porque los dominios variables son de la SEQ ID NO: 10 (VH) y 11 (VL). Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano (CH2527) se caracteriza en que comprende un dominio VH de cadena pesada variable que comprende las CDR de SEQ ID NO: 23, 24 y 25, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y un dominio variable VL que comprende las CDR de SEQ ID NO: 26, 27 y 28, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera. Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano se caracteriza porque los dominios variables son de la SEQ ID NO: 21 (VH) y 22 (VL). Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 se caracteriza en que es humanizado. Preferiblemente, el MAb de CD3 de acuerdo con la invención se une al mismo epítipo de CD3 ϵ que H2C y/o CH2527.

45 Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a ROR1 se caracteriza en que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende como las CDR de cadena ligera variable respectivas las CDR de SEQ ID NO: 3, 4, 5 y un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende como las CDR de la cadena pesada variable respectivas las CDR de SEQ ID NO: 7, 8, 9. Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a ROR1 se caracteriza en que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) una secuencia que es al menos 90% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2 y como dominio de cadena pesada variable (VH) una secuencia que es al menos 90% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 6. Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a ROR1 se caracteriza en que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) la secuencia de SEQ ID NO: 2 y como dominio variable de cadena pesada (VH) la secuencia de la SEQ ID NO: 6. Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a ROR1 se caracteriza en que es humanizado. Preferiblemente, el Mab de ROR1 de acuerdo con la invención se une al mismo epítipo de ROR1 que el Mab que se mencionó anteriormente.

60 Una realización adicional de la invención es un procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico según la invención que comprende las etapas de transformar una célula huésped con uno o más vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o fragmentos respectivos, cultivar la huésped célula bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

65 Preferiblemente, el procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico según la invención comprende

las etapas de transformar una célula huésped con uno o más vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican

- a) un fragmento F(ab)₂ de un anticuerpo anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1, en el que en un brazo los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen entre sí y
 - 5 b) un fragmento Fab de un anticuerpo que se une de manera específica a CD3 unido al extremo N-terminal de un dominio VL o VH de dicho fragmento de anticuerpo F(ab)₂ que se une específicamente a ROR1.
 - c) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
 - d) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.
- 10 Preferiblemente, el procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico según la descripción se caracteriza en que comprende las etapas de
- a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos, que forman juntos una molécula de anticuerpo que es un fragmento F(ab)₂ de un anticuerpo anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1, en el que en un brazo, los dominios variables VL y VH o los dominios constantes
 - 15 CL y CH1 se sustituyen entre sí y un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla de un anticuerpo que se unen específicamente a CD3 que están unidos al extremo N-terminal de un dominio VL o VH de dicho fragmento F(ab)₂ de anticuerpo que se une específicamente a ROR1,
 - b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
 - 20 c) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

Una realización adicional de la invención es una célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de acuerdo con la invención.

- 25 Una realización adicional de la invención es una célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a la primera diana y vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a la segunda diana, en la que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 están sustituidos entre sí.

- 30 Una realización preferida adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- Una realización preferida adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención para uso como un medicamento. Una realización preferida adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de tumores malignos hematológicos positivos de ROR1 que comprenden leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal (MZL), linfoma de células B grandes difusas (DLBCL), mieloma múltiple (MM) y linfoma folicular (FL). ROR1 está significativamente y de manera uniforme expresado en la superficie celular de estos diversos cánceres de la sangre. Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de leucemias y linfomas no Hodgkin que expresan ROR1. Una realización preferida de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL) de linaje de células B (B-CLL). B-CLL resulta de una mutación adquirida con el ADN de una sola célula ósea que se desarrolla en un linfocito B. Una vez que la célula ósea experimenta el cambio linfocítico, se multiplica en muchas células y con el tiempo desplazan a las células normales, ya que las células de CLL crecen y sobreviven mejor que las células normales. El resultado es el crecimiento incontrolado de células de CLL en la médula ósea, lo que lleva a un aumento en el número de células de CLL en la sangre. Los síntomas de CLL generalmente se desarrollan en el tiempo con algunos pacientes asintomáticos con solamente resultados de la prueba de sangre anormales (por ejemplo, aumento de glóbulos blancos en la sangre). Los pacientes con CLL con síntomas experimentan fatiga, falta de aliento, anemia, pérdida de peso, disminución del apetito, agrandamiento de ganglios linfáticos y del bazo e infecciones recurrentes debido a bajos niveles de inmunoglobulina y la disminución del recuento de neutrófilos (Leukemia & Lymphoma Society, 2009). Una realización preferida adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de mieloma múltiple. Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de trastornos de células plasmáticas tales como mieloma múltiple MM u otros trastornos de células B que expresan ROR1. MM es una enfermedad maligna de células B caracterizada por una expansión monoclonal y la acumulación de células plasmáticas anormales en el compartimento de la médula ósea. MM también implica células B clonales circulantes con el mismo reordenamiento del gen de IgG e hipermutación somática. MM surge de una afección premaligna asintomática llamada gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), caracterizada por los bajos niveles de células plasmáticas en la médula ósea y una proteína monoclonal. Las células de MM proliferan a una velocidad baja. MM resulta de una aparición progresiva de múltiples cambios cromosómicos estructurales (por ejemplo, translocaciones desequilibradas). MM implica la interacción mutua de las

células plasmáticas malignas y el microambiente de la médula ósea (por ejemplo, células normales del estroma de la médula ósea). Los signos clínicos de MM activo incluyen un pico de anticuerpos monoclonales, las células plasmáticas inundan la médula ósea, lesiones óseas líticas y la destrucción ósea resultante de la sobreestimulación de osteoclastos (Dimopoulos y Terpos, *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 7: vii143-150). Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de tumores sólidos positivos de ROR1, tales como cánceres de mama humanos (Zhang S, *PLoS One* 2012; 7 (3): e31127) y cánceres de pulmón (Yamaguchi T, *Cancer Cell* 2012; 21 (3): 348).

Un ejemplo adicional de la descripción es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para tales tratamientos.

Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica se administran una vez o dos veces a la semana, preferiblemente a través de administración subcutánea (por ejemplo, preferiblemente en el intervalo de dosis de 0,25 a 2,5 mg/m²/semana o dos veces a la semana). Debido a las actividades de citotoxicidad superiores del anticuerpo de acuerdo con la invención, se puede administrar por lo menos en la misma magnitud de intervalo de dosis clínica (o incluso inferior) en comparación con anticuerpos monoespecíficos convencionales o anticuerpos biespecíficos convencionales que no son biespecíficos de células T (es decir, no se unen a CD3 en un brazo). Se prevé que para un anticuerpo de acuerdo con la invención se prefiera la administración subcutánea en entornos clínicos (por ejemplo, en el intervalo de dosis de los 100 - 1000 mg/m²/semana o dos veces a la semana). Un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende una parte Fc se elimina con una semivida de aproximadamente 12 días, lo cual permite una administración de al menos una o dos veces/semana. Otra ventaja del anticuerpo de acuerdo con la invención es un peso molecular (es decir, aproximadamente 100 a 150 kDa) más elevado que el límite de tamaño de filtración renal (50 -70 kDa), incluso si el anticuerpo no tiene parte Fc. Este peso molecular permite una semivida de eliminación de 6-72 horas y hace que sean posibles las administraciones subcutáneas una vez o dos veces a la semana.

Descripción de las Figuras

Figura 1. Anticuerpos biespecíficos preferidos que comprenden los fragmentos Fab (específicos para CD3 y ROR1) con o sin la parte Fc, tal como se especifica: (1) Fab de ROR1-Fc-Fab de CD3-Fab de ROR1; (2) Fc-Fab de CD3-Fab de ROR1; (3) Fab de CD3-Fab de ROR1- Fab de ROR1; (4) Fab de CD3-Fab de ROR1. Preferiblemente, el Fab de CD3 incluye un cruce CH1-CL para reducir el desapareamiento de LC y productos secundarios. El Fab de CD3 y Fab de ROR1 están unidos el uno al otro con enlazadores flexibles.

Figura 2. Detección de ROR1 en la superficie celular de (A) las células primarias de CLL y (B) células de MM RPMI8226 y células Rec-1 de MCL utilizando anticuerpo anti-ROR1IgG marcado con Alexa488 o anticuerpo Fc anti-humano marcado con Alexa647. Los gráficos que muestran un aumento de la señal MFI en comparación con el valor basal.

Figura 3. La unión de anticuerpo IgG1 anti-ROR1 en células RPMI8226 positivas de ROR1 (A) y la no unión a células MKN45 negativas de ROR1 (B). La intensidad de fluorescencia media para IgG anti-ROR1 representada en función de las concentraciones de anticuerpos anti-ROR1 (de 0,14 a 100 nM).

Figura 4. Índice de internalización (%) de (A, B) anticuerpo IgG1 anti-ROR1 a una concentración de 1 nM y (A, C) anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 en células primarias de B-CLL positivas de ROR1 después de la incubación de 2 horas a 37 °C, tal como se detecta por FACS utilizando el anticuerpo anti-Fc humano marcado secundario (detección indirecta). (A, B) Anticuerpo IgG anti-ROR1 (1 nM) internalizado aproximadamente 12,5% en células primarias de B-CLL. (A, C) Anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 (1 nM) mostró un índice de internalización de 27,1% en las células primarias de B-CLL en las mismas condiciones experimentales que como se mide por FACS (detección indirecta). La internalización se calculó basándose en el valor de MFI en el tiempo 0, la línea de base, y se calculó utilizando la fórmula descrita anteriormente.

Figura 5. Índice de internalización (%) de anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 (1 nM) en células primarias de B-CLL después de una incubación de 2 horas a 37 °C en presencia o ausencia de óxido de fenilarsina (PAO) detectado por FACS utilizando el anticuerpo anti-Fc humano marcado secundario (detección indirecta). Se observó una disminución del 91% en la señal de MFI en células primarias de B-CLL después de una incubación de 2 horas a 37 °C sin PAO. Sin embargo, cuando se incubaron las células B-CLL en presencia de PAO (3 μM), aún se observó una disminución del 90% en la señal de MFI, lo que indica que la pérdida en la señal de MFI no era debida a la interiorización del anticuerpo, sino probablemente a la disociación.

Figura 6. Los índices de internalización de anticuerpos TCB2+1 y anticuerpo IgG anti-ROR1 (1 nM) en las células de MM RPMI8226 después de una incubación de 2 horas a 37 °C, medidos en dos experimentos independientes. Los resultados demuestran que TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 tiene un índice de internalización de menos del 15% en las células RPMI.

Figura 7. La unión de anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en células T Jurkat. La intensidad de fluorescencia media para los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 representada en función de las concentraciones de anticuerpo (de 3 a 500 nM); anticuerpos TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 en células Jurkat. No se alcanzaron valores de EC50 y la unión máxima de anticuerpos TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 a las células Jurkat. El anticuerpo de control de isotipo DP47 o anticuerpo IgG anti-ROR1 no se unieron a las células T Jurkat.

Figura 8. La unión de anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en (A) células RPMI8226 positivas de ROR1 y no unión a (B) células MKN45 negativas de ROR1. La intensidad de fluorescencia media representada en función de las concentraciones de anticuerpo (de 0,14 a 100 nM).

Figura 9. Regulación positiva de marcadores de activación por los anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en (A) células Rec-1 y (B) células RPMI8226 positivas de ROR1. La intensidad de fluorescencia media representada en función de las concentraciones de anticuerpo (de 0,01 pM a 100 nM). (A) Se observó un aumento dependiente de la concentración en la intensidad de fluorescencia media del marcador de activación tardía CD25 limitado a células T CD8 en células Rec-1. La activación dependiente de la concentración significativa de células T CD8 por anticuerpo TCB 1+1 anti-ROR1/anti-CD3 en presencia de las células Rec-1 positivas de ROR1. La señal máxima se alcanzó a 100 pM de anticuerpo. La activación no específica de células T CD8 fue mínima después de la unión de CD3 en las células T, pero sin unión en las células diana positivas de ROR1 mediante el uso de construcciones de TCB sin enlazar. La activación de las células T CD8 fue débil con anticuerpo TCB 2+1 anti-ROR1/anti-CD3, tal como se muestra por un aumento débil, pero perceptible, en la intensidad de fluorescencia media de CD25. Sin embargo, la activación no específica de células T no se puede descartar. (B) Regulación positiva de la concentración de CD25 en las células T CD8 T mediada por anticuerpos TCB1 + 1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2 + 1 anti-ROR1/anti-CD3 en presencia de células de MM RPMI8226 positivas de ROR1. A la concentración más alta (100 pM) de anticuerpos TCB probados no hubo activación no específica de las células T CD8, tal como se muestra con construcciones TCB no enlazadoras.

Figura 10. Muerte de células T redirigida de células diana de MM RPMI8226 positivas de ROR1 por las células T CD8 activadas por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3. La citotoxicidad específica de células diana (lisis tumoral) inducida por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 se midió mediante la liberación de LDH. (A) Experimento 1 (punto de tiempo de 14 horas): 30% de lisis tumoral ya se observaba con la concentración más baja ensayada de 0,01 pM de anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y hasta que se alcanzó una lisis tumoral de 37,5% con 30 nM de anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en condiciones experimentales que reflejan una relación clínicamente relevante E:T de 3: 1 es decir, 3 células T CD8 para 1 célula diana RPMI 8226. La lisis tumoral del 37,5% observada a 30 nM, tal como se detecta por la liberación de LDH, no podría haberse atribuido solamente a la destrucción no específica de células diana, ya que sólo había un 17% de lisis de células diana no específicas con 30 nM de TCB1 + 1 no enlazadora (es decir, se une a células efectoras, pero no a las células diana). Para anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3, una lisis máxima de células diana del 30% ya se observó en la concentración más baja ensayada de 0,2 fM y no hubo respuesta dependiente de la concentración con concentraciones crecientes de hasta 10 nM. TCB2 + 1 no enlazadora 30 nM tenía una lisis tumoral de cerca del 30%. (B) Experimento 2 (punto de tiempo 20 h): se observó un 30-40% de lisis de células diana con los anticuerpos TCB1+1 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 a una concentración de 100 pM, mientras que los controles TCB no enlazadores no indujeron ninguna lisis tumoral a la misma concentración.

Descripción detallada de la invención

El término "ROR1", como se usa en el presente documento, se refiere a ROR1 humano (sinónimos: receptor transmembrana de proteína tirosina quinasa ROR1, EC=2.7.10.1, tirosina quinasa neurotrófica, receptor relacionado 1, UniProtKB Q01973) que es un receptor de proteína tirosina quinasa. El dominio extracelular de ROR1 consiste según UniProt en los aminoácidos 30-406. El término "anticuerpo contra ROR1, anticuerpo anti-ROR1 o Mab de ROR1" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a ROR1 humano. El anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de ROR1 (aminoácidos M1-V406 de la SEQ ID NO: 1). El anticuerpo se une específicamente a fragmentos del dominio extracelular, que son el dominio de tipo C2 similar a Ig (aminoácidos Q73-V139 de la SEQ ID NO: 1), el dominio Frizzled (aminoácidos E165-I299 de la SEQ ID NO: 1), o el dominio de kringle (aminoácidos K312-C391 de la SEQ ID NO: 1). Estos fragmentos se mencionan en WO2005100605. Se prefiere además que el anticuerpo se una específicamente al fragmento del dominio extracelular WNISSELNKDSYLTL (SEQ ID NO.18) de ROR1. Este fragmento se menciona en Daneshmanesh AH et al., Int. J. Cancer, 123 (2008) 1190-1195.

El término "CD3ε o CD3" como se usa en el presente documento se refiere a CD3ε humano que se describe en UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). El término "anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo que se une a CD3ε. Preferiblemente, el anticuerpo comprende un dominio variable VH que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, 13 y 14 que corresponden respectivamente aCDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y un dominio variable VL que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, 16 y 17, como respectivamente, CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo comprende los dominios variables de la SEQ ID NO: 10 (VH) y SEQ ID NO: 11 (VL). Preferiblemente, el anticuerpo comprende un dominio variable VH que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 23, 24 y 25, que corresponden respectivamente a CDR1,

CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y un dominio variable VL que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 26, 27 y 28, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo comprende los dominios variables de la SEQ ID NO: 21 (VH) y SEQ ID NO: 22 (VL). Los anticuerpos anti-CD3 que se muestran en SEQ ID NO: 10 y 11 y 21 y 22 derivan de SP34 y tienen secuencias similares y las mismas propiedades en lo que respecta a la unión a epítipo que el anticuerpo SP34.

"Se une específicamente a CD3 o ROR1" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD3 o ROR1 (las dianas) con una afinidad suficiente, de manera que el anticuerpo es útil como agente terapéutico en el reconocimiento de CD3 o ROR1. En algunas realizaciones, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD3 o ROR1 a una proteína que no es CD3 o ROR1 no relacionada es aproximadamente 10 veces, preferiblemente > 100 veces menor que la unión del anticuerpo a CD3 o ROR1, tal como se mide, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), por ejemplo Biacore®, inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o citometría de flujo (FACS). Preferiblemente, el anticuerpo que se une a CD3 o ROR1 tiene una constante de disociación (Kd) de 10^{-8} M o menos, preferiblemente de 10^{-8} M a 10^{-13} M, preferiblemente de 10^{-9} M a 10^{-13} M. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se une a un epítipo de ROR1 que se conserva entre ROR1 de diferentes especies y/o un epítipo de CD3 que se conserva entre CD3 de diferentes especies, preferiblemente entre humano y cynomolgus. "Anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3 y ROR1" o "anticuerpo de acuerdo con la invención" se refiere a una definición respectiva para la unión a ambas dianas. Un anticuerpo se une específicamente a ROR1 (o CD3 o ROR1 y CD3), no se une a otros antígenos humanos. Por lo tanto, en un ELISA, los valores de DO para dichas dianas no relacionadas serán igual o inferiores a los del límite de detección del ensayo específico, preferiblemente igual o inferiores a 1,5 pM, o igual o inferior a los valores de DO de las muestras de control sin ROR1 unido a la placa o con células HEK293 no transfectadas.

Los anticuerpos anti-ROR1 se analizan por ELISA para la unión a ROR1 humano utilizando ROR1 unido a la placa. Para este ensayo, se utiliza una cantidad de ROR1 unido a la placa preferiblemente o 1,5 nM y la concentración o concentraciones que varían preferiblemente de 1 pM a 200 nM de anticuerpo anti-ROR1. Un anticuerpo de ROR1 para el que su unión a ROR1 es al menos 20% mayor que los valores de DO de las muestras de control sin ROR1 unido a la placa o con células HEK293 no transfectadas de acuerdo con la invención es un anticuerpo anti-ROR1 "que se une a ROR1 humano en un ensayo ELISA". Un anticuerpo a modo de ejemplo es un anticuerpo anti-ROR1, caracterizado en ser IgG1 de tipo kappa (κ) humana que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) la secuencia de SEQ ID NO: 2 y como dominio variable de cadena pesada (VH) la secuencia de SEQ ID NO: 6, o las CDR respectivas mostradas en la SEQ ID NO: 3, 4, 5, 7, 8, 9 (nombradas más también como "dicho anticuerpo anti-ROR1 bivalente").

El término "anticuerpo de acuerdo con la invención que no se internaliza" como se usa en este documento significa un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención con propiedades de reducción de MFI caracterizado porque en un ensayo basado en células a 37 °C durante 2 horas, utilizando células B-CLL positivas de ROR1, y utilizado a una concentración de anticuerpo de 1 nM, en el que no se internaliza significa que la intensidad de fluorescencia media (MFI), detectada mediante citometría de flujo, tras la unión a células positivas de ROR1 medida en el tiempo 0 no se reduce más de 50%, preferiblemente no más de 30% mediante internalización cuando se volvió a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención no se internaliza en las células B-CLL positivas de ROR1, por lo tanto la unión de dicho anticuerpo anti-ROR1 a células B-CLL positivas de ROR1 no se reduce más de 50%, preferiblemente no más de 30 %, cuando se incubó dicho anticuerpo a 37 °C durante 2 h en tal ensayo basado en células, tal como se describe aquí.

Se prefiere también que un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención muestre en un ensayo basado en células a 37 °C durante 2 horas utilizando células de B-CLL positivas en ROR1 y a una concentración de anticuerpo de 1 nM, una disminución en la intensidad de fluorescencia media por internalización desde el tiempo 0 a 2 horas a 37 °C (Δ MFI), medida mediante citometría de flujo, que está de 120% a 0%, preferiblemente de 100% a 0%, de la Δ MFI de un anticuerpo anti-ROR1 bivalente de IgG1 humana de tipo kappa (κ) que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) la secuencia de SEQ ID NO: 2 y como dominio variable de cadena pesada (VH) de la secuencia de SEQ ID NO: 6, en la misma concentración y condiciones experimentales.

La línea celular ACC-67 se describe en Saltman, D. et al., Leukemia Research 14 (1990) 381-387 y está disponible de Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania, en el colección abierta.

Para una terapia utilizando un anticuerpo biespecífico de células T que comprende un anticuerpo anti-ROR1, se prefiere que el anticuerpo no se internaliza como se definió anteriormente para facilitar una sinapsis inmune estable entre la célula tumoral y la célula T y una citotoxicidad redirigida mediada por células T eficaz.

El término "reducción de la intensidad de fluorescencia media" (Δ MFI) que refleja la internalización de dicho anticuerpo anti-ROR1 a las células positivas de ROR1" o "reducción de MFI" como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de la reducción de MFI tal como se calcula para cada anticuerpo de ROR1 en relación al control de IgG humana no específica (MFI_{fondo}) y anticuerpos de ROR1 mantenidos en hielo (MFI_{max}) mediante el uso de la fórmula Δ MFI = $100 - 100 \times [(MFI_{\text{experimental}} - MFI_{\text{fondo}})/(MFI_{\text{max}} - MFI_{\text{fondo}})]$. Una $MFI_{\text{experimental}}$ es la MFI medido con dicho

anticuerpo de ROR1 después de la incubación de 2 horas a 37 °C. Una reducción de la MFI que es bloqueada e invertida al menos un 75% por el inhibidor de la endocitosis óxido de fenilarsina 10 μ M es causada por ejemplo por la internalización de anticuerpos, mientras que una reducción de MFI que no es bloqueada por óxido de fenilarsina es causada por la disociación del anticuerpo. La internalización de anticuerpos anti-ROR1 es conocida en el estado de la técnica (Baskar et al, Clin Cancer Res, 14 (2): 396-404 (2008)).

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza en que un aumento en el valor de MFI en el tiempo de 2 horas en presencia de óxido de fenilarsina (PAO) 3 μ M en comparación con valor de MFI en el tiempo de 2 horas en ausencia de PAO no es más de 30%, preferiblemente no más de 20%, preferiblemente no más que 10%, incluso no más del nivel de detección del valor de MFI en el tiempo 0.

El término "diana", como se usa en este documento, significa ROR1 o CD3. El término "primera diana y segunda diana" significa CD3 como primera diana y ROR1 como segunda diana o significa ROR1 como primera diana y CD3 como segunda diana.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo. Un anticuerpo consiste en dos pares de una "cadena ligera" (LC) y una "cadena pesada" (HC) (tales pares de cadena ligera (LC)/cadena pesada se abrevian en el presente documento como LC/HC). Las cadenas ligeras y cadenas pesadas de dichos anticuerpos son polipéptidos que consisten en varios dominios. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera VL y un dominio constante de cadena ligera CL. Los dominios variables VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los "dominios constantes" de la cadena pesada y de la cadena ligera no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a una diana, pero muestran diversas funciones efectoras.

El término "carente del dominio Fc" tal como se utiliza en el presente documento, significa que los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la divulgación no comprenden un dominio CH2, CH3 o CH4; es decir, la cadena pesada constante consiste únicamente en uno o más dominios CH1.

El término "anticuerpo" incluye por ejemplo, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos manipulados genéticamente (anticuerpos variantes o anticuerpos mutantes), siempre que sus propiedades características se conserven. Especialmente preferidos son los anticuerpos humanos o humanizados, especialmente como anticuerpos humanos o humanizados recombinantes.

El término "que comprende" en lo que se refiere al anticuerpo biespecífico como se usa en el presente documento significa que el anticuerpo biespecífico comprende como enlazadores de CD3 y ROR1 sólo aquellos enlazadores mencionados. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico según la divulgación que comprende un anticuerpo anti-ROR1 monovalente que se une específicamente a ROR1 y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3 tiene con respecto a la unión a CD3 y ROR1 sólo una valencia de unión para CD3 y sólo una valencia para ROR1 y por lo tanto es bivalente. Un anticuerpo biespecífico según la invención que comprende un anticuerpo bivalente anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1, y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3 tiene en lo que respecta a la unión a ROR1 dos valencias de unión y con respecto a la unión a CD3 una valencia y por lo tanto es trivalente. Preferiblemente, el anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3 está ligado covalentemente en su C-terminal al extremo N-terminal de una cadena variable del anticuerpo que se une específicamente a ROR1.

Tal como se usa en el presente documento, "fragmento Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH y el primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. Dos composiciones de cadenas diferentes de una molécula Fab de cruce son posibles y están comprendidas en los anticuerpos biespecíficos de la invención: Por una parte, las regiones variables de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian, es decir, el Fab molécula de cruce comprende una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena ligera (VL) y la región constante de cadena pesada (CH1), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de cadena pesada (VH) y la región constante de cadena ligera (CL). Esta molécula Fab de cruce también se conoce como crossFab (VLVH). Por otro lado, cuando se intercambian las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de Fab, la molécula Fab de cruce comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de cadena pesada (VH) y la región constante de cadena ligera (CL), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de cadena ligera (VL) y la región constante de cadena pesada (CH1). Esta molécula Fab de cruce también se conoce como crossFab (CLCH1). El término "fragmento Fab" también incluye la totalidad o parte de la región bisagra, como el fragmento Fab'. Como se usa en el presente documento, "fragmento F(ab)₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo mono-específico bivalente sin una parte Fc. Preferiblemente, un fragmento F(ab)₂ se liga en el extremo C-terminal mediante un enlace o enlaces disulfuro en la región bisagra y por lo general un "fragmento F(ab)₂" es un fragmento F(ab')₂.

El término "Fab de ROR1" como se usa dentro de la invención indica un fragmento Fab del anticuerpo que se une específicamente a ROR1. Debido al intercambio de las regiones variables o las regiones constantes en el fragmento Fab de anticuerpo anti-ROR1 (Fab de ROR1 Fab), dicho Fab de ROR1 se refiere como "ROR1cross Fab" o "fragmento Fab de ROR1 cruzado". De acuerdo con la invención, el Fab de ROR1 no es un ROR1crossFab. Por "conectado" se entiende que los fragmentos Fab están unidos preferiblemente por enlaces peptídicos, ya sea directamente o a través de uno o más enlazadores peptídicos. El término "Fab de CD3" como se usa dentro de la invención indica un fragmento Fab del anticuerpo que se une específicamente a CD3. El Fab de CD3 está unido en su extremo N-terminal al C-terminal de Fab de ROR1. Debido al intercambio de las regiones variables o las regiones constantes en Fab de CD3, dicho Fab de CD3 se refiere como "CD3 crossFab" o "fragmento Fab de CD3 cruzado". De acuerdo con la invención, el Fab de CD3 es preferiblemente un crossFab.

El término "enlazador peptídico" como se usa dentro de la invención indica un péptido con secuencias de aminoácidos, que es preferiblemente de origen sintético. Estos enlazadores peptídicos de acuerdo con la invención se usan para conectar uno de los fragmentos Fab al extremo C- o N-terminal del otro fragmento Fab para formar un anticuerpo multiespecífico según la invención. Preferiblemente, dicho enlazadores peptídicos son péptidos con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 5 aminoácidos, preferiblemente con una longitud de 5 a 100, más preferiblemente de 10 a 50 aminoácidos. En una realización dicho péptido enlazador es $(GxS)_n$ o $(GxS)_nG_m$ con $G =$ glicina, $S =$ serina, y $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ o } 6, y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$ o $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ o } 5 y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, preferiblemente $x = 4 y n = 2 \text{ o } 3$, más preferiblemente con $x = 4, n = 2$. Además, los enlazadores pueden comprender (una parte de) una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización dicho péptido enlazador es $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO 19).

Hay cinco tipos de cadenas pesadas de anticuerpo de mamíferos indicadas por las letras griegas: α , δ , ϵ , γ , y μ (Janeway CA, Jr et al (2001) Immunobiology quinta ed, Garland Publishing). El tipo de cadena pesada presente define la clase de anticuerpo; estas cadenas se encuentran en anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, respectivamente (Rhoades RA, Pflanzler RG (2002). Human Physiology, cuarta ed., Thomson Learning). Cadenas pesadas distintas difieren en tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ tienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante y la región variable. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en anticuerpos de isotipo diferente. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta de tres dominios constantes CH1, CH2, y CH3 (en una línea), y una región bisagra para una mayor flexibilidad (Woof J, Burton D Nat Rev Immunol 4 (2004) 89- 99); cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta de cuatro dominios constantes CH1, CH2, CH3, y CH4 (Janeway CA, Jr et al (2001). Immunobiology. quinta ed., Garland Publishing). La región variable de la cadena pesada difiere en anticuerpos producidos por diferentes células B, pero es la misma para todos los anticuerpos producidos por una sola célula B o un clon de células B. La región variable de cada cadena pesada es de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud y se compone de un único dominio de anticuerpo. En mamíferos sólo hay dos tipos de cadena ligera, que se llaman lambda (λ) y kappa (κ). Una cadena ligera tiene dos dominios sucesivos: un dominio constante CL y uno dominio variable VL. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos.

Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, que comprende una parte Fc, puede ser de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, preferiblemente IgG o IgE), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2, preferiblemente IgG1), donde ambos anticuerpos, de los cuales se deriva el anticuerpo biespecífico bivalente de acuerdo con la invención, tienen una parte Fc de la misma subclase (por ejemplo, IgG1, IgG4 y similares, preferiblemente IgG1), preferiblemente del mismo alotipo (por ejemplo, de raza caucásica).

Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por el experto en la materia y está definido en base de la escisión por papaína de anticuerpos. Los anticuerpos de acuerdo con la invención, que comprenden una parte Fc, contienen como parte Fc, preferiblemente una parte Fc derivada de origen humano y, preferiblemente, todas las demás partes de las regiones constantes humanas. La parte Fc de un anticuerpo está directamente implicada en la activación del complemento, unión a C1q, activación de C3 y unión al receptor Fc. Mientras que la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento depende de ciertas condiciones, la unión a C1q es causada por los sitios de unión definidos en la parte Fc. Tales sitios de unión son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, por Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, DR, et al, Nature 288 (1980) 338-344.; Thommesen, JE, et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, EE, et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., y otros, Immunology 86 (1995) 319-324; y EP 0 307 434. Tales sitios de unión son, por ejemplo L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat, ver a continuación). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran la activación del complemento, unión a C1q y la activación de C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento, no se unen a C1q y no activan C3. Preferiblemente, la parte Fc es una parte Fc humana.

La cadena pesada constante de un anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente del tipo IgG1 humana y la cadena ligera constante es preferiblemente de tipo lambda (λ) o kappa (κ) humana, preferiblemente de tipo kappa (κ) humana.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

5 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Se prefieren los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente invención son aquellos en los que la región constante se ha modificado o
10 cambiado de la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente en lo que respecta a la unión a C1q y/o la unión al receptor Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos también se denominan como "anticuerpos intercambiados de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN recombinante y transfección de genes convencionales bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, SL, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 (1984) 6851-6855; patentes de Estados Unidos No. 5.202.238 y 5.204.244.

20 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que la estructura o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina original. En una realización preferida, una CDR murina se injerta en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., et al, Nature 332 (1988) 323-327.; y Neuberger, MS, et al., Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen las dianas indicadas
25 anteriormente para los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcados por la presente invención son aquellos en los que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente de la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente en lo que respecta a la unión a C1q y/o la unión al receptor Fc (FcR).

30 El término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, MA, y van de Winkel, JG, Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes de línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación de la diana (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al, Year Immunol 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom, HR, y Winter, G., J. Mol Biol 227 (1992) 381-388; Marks, JD, et al, J. Mol Biol 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); y Boerner, P., et al, J. Immunol 147 (1991) 86-95).

45 El término "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NSO o CHO o de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención han sido sometidos a hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de líneas
50 germinales de anticuerpos humanos in vivo.

55 El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza en el presente documento indica cada uno del par de cadenas ligeras y pesadas que está implicado directamente en la unión del anticuerpo a la diana. Los dominios de cadenas variables ligera y pesada humanas tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR), cuyas secuencias son ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones estructurales y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión a diana. Las regiones CD3 de cadena ligera y pesada de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y, por tanto, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión a diana de un anticuerpo" cuando se utilizan en el presente documento se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables para la unión a diana. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "estructurales" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en el presente documento. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden de N- a C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada cadena están separadas por dichos aminoácidos estructurales. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión a diana. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5ª ed., Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD (1991).

El término "diana" o "molécula diana", tal como se usa en el presente documento, se utilizan de forma intercambiable y se refieren a ROR1 humano y CD3 ϵ humano.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse de forma específica a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el determinante epítipo incluye agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, puede tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de una diana que está unida por un anticuerpo.

En general, hay dos vectores que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de dicho anticuerpo que se une específicamente a la primera diana, y otros dos vectores que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de dicho anticuerpo que se une específicamente a la segunda diana. Uno de los dos vectores codifica la cadena ligera respectiva y el otro de los dos vectores codifica la cadena pesada respectiva. Sin embargo, en un procedimiento alternativo para la preparación de un anticuerpo biespecífico según la invención, sólo un primer vector que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo que se une específicamente a la primera diana y sólo un segundo vector que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo que se une específicamente a la segunda diana se puede utilizar para la transformación de la célula huésped.

El término "ácido nucleico o molécula de ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin considerar el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen progenies variantes que tienen la misma función o actividad biológica que se criba en la célula originalmente transformada. Cuando se pretendan designaciones diferentes, quedará claro a partir del contexto.

El término "transformación" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico en una célula huésped. Si se utilizan células sin barreras de pared celular formidables como células huésped, la transfección se lleva a cabo por ejemplo mediante el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, tal como se describe por Graham y Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff. Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como la inyección nuclear o mediante fusión de protoplastos. Si se utilizan células procariotas o células que contienen construcciones sustanciales de pared celular, por ejemplo un procedimiento de transfección es el tratamiento con calcio utilizando cloruro de calcio como se describe por Cohen SN, et al, *PNAS* 1972, 69 (8): 2110-2114.

La producción recombinante de anticuerpos usando transformación es bien conocida en el estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S. C, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, RG, et al., *Arzneimittelforschung* 48 (1998) 870-880, así como en US6331415 y US4816567.

Tal como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el cual un ácido nucleico se transcribe en ARNm y/o al proceso por el cual el ARNm transcrito (también denominado transcrito) posteriormente se traduce en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente como producto génico. Si el polinucleótido deriva de ADN genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el empalme del ARNm.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular autoreplicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), la replicación de vectores que

funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN, y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción de ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones que se han descrito.

5 Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula huésped apropiada, puede ser transcrito y traducido en un polipéptido. Un "sistema de expresión" generalmente se refiere a una célula huésped adecuada compuesta de un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

10 Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención se producen preferiblemente por medios recombinantes. Tales procedimientos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el posterior aislamiento del polipéptido anticuerpo y por lo general la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o sus fragmentos se insertan en vectores de expresión mediante procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas adecuadas como células CHO, células NSO, células SP2/0, células HEK293, células COS, levadura, o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis). Los anticuerpos biespecíficos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se lleva a cabo con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, cromatografía en columna y otros bien conocidos en la técnica. Ver Ausubel, F., et al., Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987).

25 La expresión en células NSO se describe por, por ejemplo, Barnes, LM, et al, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; y Barnes, LM, et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe por, por ejemplo, Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferido (HEK293) es descrito por Schlaeger, E.- J., y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.- J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

30 Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

35 El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está posicionado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

45 Los anticuerpos biespecíficos se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN o ARN que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de dicho ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células HEK293, células CHO, o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

55 Las variantes de secuencia de aminoácidos (o mutantes) del anticuerpo biespecífico se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos. Tales modificaciones se pueden realizar, sin embargo, sólo en una gama muy limitada, por ejemplo, tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de anticuerpo mencionadas anteriormente, tales como el isotipo de IgG y la unión a diana, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de proteína o facilitar la purificación.

60 Los enlazadores biespecíficos de células T (TCB) tienen una potencia dependiente de concentración/ocupación de receptores celulares tumorales muy elevada en la muerte celular (por ejemplo, CE₅₀ en ensayos de muerte celular in vitro en el rango de submolar o picomolar bajo; Dreier et al. *Int J Cancer* 2002). El enlazador biespecífico de células T (TCB) se administran en dosis mucho más bajas que los anticuerpos mono-específicos convencionales. Por ejemplo,

blinatumomab (CD19xCD3) se administra a una dosis intravenosa continua de 5 a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ (es decir, sólo 0,35-0,105 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$) para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda o 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ para el tratamiento de linfoma no de Hodgki, y las concentraciones en suero a estas dosis están en el intervalo de 0,5 a 4 ng/ml (Klinger et al, Blood 2012; Topp et al, J Clin Oncol 2011; Goebeler et al Ann Oncol 2011). Debido a que las dosis bajas de TCB pueden ejercer una alta eficacia en los pacientes, se prevé que para un anticuerpo de acuerdo con la invención, la administración subcutánea es posible y preferible en el entorno clínico (preferiblemente en el intervalo de dosis de 0,25 a 2,5 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$ o dos veces a la semana). Incluso a estas concentraciones/dosis/ocupaciones del receptor bajas, los TCB pueden causar efectos adversos considerables (Klinger et al., Blood 2012).

En principio, es posible producir anticuerpos biespecíficos contra CD3 y ROR1 en todos los formatos conocidos en el estado de la técnica. Una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes se han desarrollado en el pasado reciente, por ejemplo, mediante fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (véase, por ejemplo Kontermann RE, mAbs 4: 2, (2012) 1-16). Los anticuerpos biespecíficos en los que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen unos por otros se describen en WO2009080251 y WO2009080252. Los formatos de anticuerpos y formatos de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos son también pepcuerpos (WO200244215), Nuevo Receptor de Antígeno ("NAR") (WO2003014161), dímeros diacuerpo-diacuerpo "TandAbs" (WO2003048209), scFv modificado con óxido de polialquileno (US7150872), anticuerpos de conejo humanizados (WO2005016950), dominios de inmunoglobulina sintéticos (WO2006072620), diacuerpos covalentes (WO2006113665), flexicuerpos (WO2003025018), anticuerpos de dominio, dAB (WO2004058822), vaccicuerpo (WO2004076489), anticuerpos con estructura de primate del nuevo mundo (WO2007019620), conugado anticuerpo-fármaco con enlazadores escindibles (WO2009117531), anticuerpos IgG4 con región de bisagra eliminada (WO2010063785), anticuerpos biespecíficos con IgG4, como dominios CH3 (WO2008119353), anticuerpos de camélidos (US6838254), nanocuerpos (US7655759), diacuerpos CAT (US5837242), scFv2 biespecíficos dirigidos contra antígeno de diana y CD3 (US7235641),), planticuerpos sIgA (US6303341), minicuerpos (US5837821), IgNAR (US2009148438), los anticuerpos con bisagra y regiones Fc modificadas (US2008 227958, US20080181890), anticuerpos trifuncionales (US5273743), triomabs (US6551592), troycuerpos (US6294654).

Sin embargo, un anticuerpo de acuerdo con la divulgación que está desprovisto de una parte Fc tiene una ventaja de seguridad debido a la falta de posibilidad para inducir reacciones de infusión mediadas por Fc. Debido a la fuerte potencia de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención en la destrucción de células diana in vitro (por ejemplo, en el rango subnanomolar e incluso picomolar) y al hecho de que ROR1 también se expresa en células normales (por ejemplo, los adipocitos humanos normales), se prefiere que el anticuerpo biespecífico pueda ser eliminado rápidamente de la circulación después de haber sido administrado. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico de células T desprovisto de una parte Fc de acuerdo con la divulgación tiene una ventaja de seguridad y se elimina rápidamente de la circulación en el caso de toxicidad.

Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación, que tiene como dos o tres fragmentos Fab un peso molecular de aproximadamente 100 kDa y 143 kDa, respectivamente, es decir, más grandes que el límite del tamaño de filtración del riñón pero sin un Fc, proporciona a los TCB una semivida de 6 a 72 horas que permiten una administración sc una o dos veces por semana, pero que es más corta en la semivida que un anticuerpo que contiene Fc (de 10 a 14 días), tiene ventajas de seguridad sobre un TCB con Fc y no muestra reacciones de infusión relacionadas con Fc.

Un anticuerpo biespecífico trivalente de acuerdo con la invención tiene ventajas sobre la potencia, la previsibilidad de eficacia y seguridad.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención con bivalencia a ROR1 y monovalencia a CD3 favorece la unión a la diana tumoral ROR1 en las células malignas sobre CD3 ϵ en células T en circulación y evita que desaparezca CD3, aumentando así la exposición al fármaco en el tumor.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Listado de secuencias

SEQ ID NO:	Nombre
1	Dominio extracelular de ROR1
2	VL de ROR1 de Mab
3	CDR1L
4	CDR2L
5	CDR3L
6	VH de ROR1 de Mab
7	CDR1H
8	CDR2H

9	CDR3H
10	VH de CD3 de Mab (H2C)
11	VL de CD3 de Mab (H2C)
12	CDR1H (H2C)
13	CDR2H (H2C)
14	CDR3H (H2C)
15	CDR1L (H2C)
16	CDR2L (H2C)
17	CDR3L (H2C)
18	Fragmento extracelular de ROR1
19	Enlazador
20	Fragmento intracelular de ROR1
21	VH de CD3 de Mab (CH2527)
22	VL de CD3 de Mab (CH2527)
23	CDR1H (CH2527)
24	CDR2H (CH2527)
25	CDR3H (CH2527)
26	CDRL1 (CH2527)
27	CDRL2 (CH2527)
28	CDRL3 (CH2527)
29	HC de IgG1 hum de ROR1 LALA PG
30	LC de IgG1 hum de ROR1
31	ROR1 x CD3VH_CLHC knob LALA PG
32	ROR1 HC hole LALA PG
33	CD3 VL_CH1
34	ROR1 x CD3 VH_CL
35	(ROR1)2 x CD3 VH_CL
36	Fc hole LALA PG

Materiales y procedimientos generales

5 Para información general de las secuencias de nucleótidos de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas humanas se proporciona en: Kabat, EA, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed, Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos se numeran y se refieren de acuerdo con la numeración EU (Edelman, GM, et al, Proc Natl Acad Sci USA 63 (1969) 78-85; Kabat, EA, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, (1991)).

10 ***Técnicas de ADN recombinante***

Los procedimientos estándar se utilizan para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general acerca de las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se proporciona en: Kabat, EA et al, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed, Publicación NIH No. 91-3242.

20 ***Síntesis de genes***

a) Los segmentos del gen deseado se preparan a partir de oligonucleótidos fabricados mediante síntesis química. Los segmentos de genes de 600-1800 pb de longitud, que están flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singulares, se ensamblan por hibridación y ligamiento de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR y posteriormente se clonaron a través de los sitios de restricción indicados, por ejemplo, KpnI/Sad o AsclI/PacI en un vector de clonación pGA4 a base de pPCRScript (Stratagene). Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirman por secuenciación del ADN. Los fragmentos de la síntesis de genes se ordenan de acuerdo con las especificaciones dadas en Geneart (Regensburg, Alemania).

b) Los segmentos del gen deseado, cuando fue necesario, se generaron por PCR usando plantillas apropiadas o fueron sintetizados por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de la PCR mediante síntesis automatizada de genes. Los segmentos de genes flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singulares se clonaron en vectores de expresión estándar o en vectores de secuenciación para su posterior análisis. El ADN plásmido se purificó a partir de bacterias transformadas utilizando kits de purificación de plásmidos disponibles comercialmente. La concentración de plásmido se determinó por espectroscopia UV. La secuencia de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmó por secuenciación de ADN. Los segmentos de genes fueron diseñados con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos

vectores de expresión. Si es necesario, los genes de codificación de proteínas se diseñaron con una secuencia de ADN de extremo 5' para un péptido líder que reconoce proteínas para la secreción en células eucariotas.

Determinación de la secuencia de ADN

5 Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de doble cadena.

Análisis de la secuencia de ADN y proteína y gestión de datos de la secuencia

10 El paquete de software versión 10.2 GCC (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) y Vector NTI Advance suite versión 8.0 de Infomax se utilizan para la creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

Vectores de expresión

15 a) Para la expresión de las variantes de anticuerpos descritas de plásmidos de expresión para células de expresión transitoria (por ejemplo, en HEK293 EBNA o HEK293-F) en base a una organización de ADNc con un promotor A de intrón de CMV o en una organización genómica con un promotor de CMV. Al lado del casete de expresión de anticuerpo, los vectores contienen un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en E. coli, y un gen de β-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en E. coli. La unidad de transcripción del gen del anticuerpo está compuesto de los siguientes elementos:

20 - sitio o sitios de restricción único en el extremo 5' - el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano,
 - seguido por la secuencia de Intrón A en el caso de la organización de ADNc,
 - una región 5' no traducida de un gen de anticuerpo humano,
 25 - una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina,
 - la cadena de anticuerpo humano (de tipo salvaje o con el intercambio de dominio), ya sea como ADNc o como organización genómica con la organización exón-intrón de inmunoglobulina
 - una región 3' no traducida con una secuencia de señal de poliadenilación, y
 - un sitio o sitios de restricción única en el extremo 3'.

30 Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpos descritas tal como se describen a continuación son generados por PCR y/o la síntesis de genes y se ensamblan con procedimientos y técnicas recombinantes conocidos y mediante conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes por ejemplo usando sitios de restricción únicos en los respectivos vectores. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonados se verifican mediante secuenciación de ADN. Para las transfecciones transitorias, se preparan mayores cantidades de plásmidos mediante la preparación de plásmido a partir de cultivos de E. coli transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

35 b) Para la generación de vectores de expresión de anticuerpo anti-ROR1, las regiones variables de las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera se subclonaron en el marco con la cadena pesada constante de IgG1 humana o la cadena ligera constante de IgG1 humana preinsertadas en el respectivo vector de expresión receptor genérico optimizado para la expresión en líneas celulares de mamíferos. La expresión del anticuerpo es impulsada por un promotor de MPSV quimérico que comprende un promotor de CMV y un promotor de MPSV seguido de una UTR 5', un intrón y un elemento MAR kappa Ig. La transcripción se termina mediante una secuencia señal sintética poliA en el extremo 3' de los CDS. Todos los vectores llevan una secuencia de ADN de extremo 5' que codifica un péptido líder que reconoce proteínas para la secreción en células eucariotas. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de EBV para la replicación del plásmido episomal en células que expresan EBNA de EBV.

40 c) Para la generación de vectores de anticuerpos biespecíficos ROR1xCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten en al menos dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y ROR1. Los restos de unión a antígeno son fragmentos Fab compuestos de una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo cada una una región variable y una región constante. Al menos uno de los fragmentos Fab es un fragmento "Crossfab", en el que los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian. El intercambio de los dominios constantes de cadena pesada y ligera dentro del fragmento Fab asegura que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tengan una disposición de dominios idénticos y por lo tanto no intercambie cadenas ligeras. El diseño de molécula biespecífica puede ser monovalente para ambos determinantes antigénicos (1 + 1) o monovalente para CD3 y bivalente para ROR1 donde un fragmento Fab está fusionado al extremo N-terminal de CrossFab interior (2 + 1). Puede ser que contiene Fc o que no contiene Fc con el fin de modular la semivida de la molécula. Una representación esquemática de las construcciones se proporciona en la Figura 1; las secuencias de las construcciones se muestran en SEQ ID NOs 1 a 36. Las moléculas fueron producidas mediante la cotransfección de las células HEK293 EBNA que crecen en suspensión con los vectores de expresión de mamífero utilizando polietilenimina (PEI). Para la preparación de construcciones CrossFab-IgG 1:1, las células fueron transfectadas con los vectores de expresión correspondientes en una relación 1:1:1:1 ("vector Fc(knob)": "cadena ligera vector": "vector cadena ligera CrossFab" : "vector cadena pesada-CrossFab"). Para la preparación de construcciones CrossFab-IgG 2+1, las células fueron transfectadas con los vectores de expresión correspondientes en una relación 1: 2: 1: 1 ("vector Fc(knob)": "vector cadena ligera": "vector cadena ligera CrossFab" : "vector cadena pesada-CrossFab").

Técnicas de cultivo celular

5 Se utilizan técnicas de cultivo celular estándar como se describe en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, JS, Dasso, M., Harford, JB, Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, KM (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Expresión transitoria en células HEK293

10 Los anticuerpos biespecíficos son expresados por cotransfección transitoria de los respectivos plásmidos de expresión en células HEK293-EBNA o HEK293-F que crecen de forma adherente en suspensión, tal como se describe a continuación.

a) Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-EBNA

15 a) Los anticuerpos biespecíficos se expresan mediante cotransfección transitoria de los respectivos plásmidos de expresión (por ejemplo, que codifican la cadena pesada y la cadena pesada modificada, así como la correspondiente cadena ligera y la cadena ligera modificada) en células HEK293-EBNA (línea celular 293 de riñón embrionario humano que expresa la diana nuclear del virus de Epstein-Barr; American Type Culture Collection de número de depósito ATCC # CRL- 10852, Lote 959 218) que crecen de forma adherente, cultivadas en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado con FCS (suero de ternera fetal, Gibco) 10% con IgG Ultra bajo, L-glutamina 2 mM (Gibco) y Geneticina 250 µg/ml (Gibco). Para la transfección, se utiliza el reactivo de transfección FuGENE™ (Roche Molecular Biochemicals) en una proporción de reactivo FuGENE™ (µl) a ADN (µg) de 4:1 (que va desde 3:1 a 6:1).

20 Las proteínas se expresan a partir de los respectivos plásmidos usando una relación molar de plásmidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada (modificada y de tipo salvaje) de 1:1 (equimolar) que varía de 1:2 a 2:1, respectivamente. Las células se alimentan en el día 3 con L-Glutamina a 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. Los sobrenadantes de cultivo celular que contienen los anticuerpos biespecíficos se recogen a partir del día 5 al 11 después de la transfección por centrifugación y se almacenan a -200C. Información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas en, por ejemplo, células HEK293 se proporciona en: Meissner, P. et al, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

25 b) El anticuerpo anti-ROR1 humano recombinante y los anticuerpos biespecíficos se produjeron en suspensión mediante cotransfección de células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamíferos utilizando polietilénimina (PEI). Las células se transfectaron con dos o cuatro vectores, dependiendo del formato. Para la IgG1 humana, un plásmido codificó la cadena pesada y el otro plásmido la cadena ligera. Para los anticuerpos biespecíficos, se cotransfectaron cuatro plásmidos. Dos de ellos codificaron las dos cadenas pesadas diferentes y los otros dos codificaron las dos cadenas ligeras diferentes. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se sembraron a 1,5 Mio células viables/ml en medio F17, suplementado con 6 mM de L-Glutamina.

b) Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

40 Los anticuerpos biespecíficos son generados por transfección transitoria de los plásmidos respectivos (por ejemplo, que codifican la cadena pesada y la cadena pesada modificada, así como la correspondiente cadena ligera y la cadena ligera modificada) utilizando el sistema HEK293-F (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células HEK293-F (Invitrogen) que crecen en suspensión en un matraz de agitación o en un fermentador de agitación en medio de expresión 293 FreeStyle sin suero (Invitrogen) se transfectan con una mezcla de los cuatro plásmidos de expresión y 293fectina o fectina (Invitrogen). Para un matraz de agitación de 2 litros, se siembran células HEK293-F (Corning) a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/ml en 600 ml y se incuban a 120 rpm, 8% de CO₂. El día después de que las células se transfectan a una densidad celular de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con aproximadamente 42 ml de la mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 µg de ADN de plásmido total (1 µg/ml) que codifica la cadena pesada o la cadena pesada modificada, respectivamente, y la cadena ligera correspondiente en una relación equimolar y B) 20 ml Opti -MEM + 1,2 ml 293 fectina o fectina (2 µl/ml). De acuerdo con el consumo de glucosa, se añade solución de glucosa durante el transcurso de la fermentación. El sobrenadante que contiene el anticuerpo secretado se recoge después de 5-10 días y los anticuerpos se purifican directamente a partir del sobrenadante o el sobrenadante se congela y se almacena.

Determinación de proteínas

60 La concentración de proteína de los anticuerpos purificados y derivados se determina mediante la determinación de la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

Determinación de la concentración de anticuerpos en sobrenadantes

65 a) La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se estima mediante

5 inmunoprecipitación con perlas de proteína A agarosa (Roche). Se lavaron 60 µl de perlas de Proteína A agarosa tres veces en TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% Nonidet-P40). Posteriormente, se aplican 1 -15 ml de sobrenadante de cultivo de células a las perlas de proteína A agarosa preequilibradas en TBS-NP40. Después de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente se lavan las perlas en una columna de Ultrafree-MC-filtro (Amicon) una vez con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml de 2 x solución salina tamponada con fosfato (2xPBS, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de citrato de Na 100 mM, pH 5,0. El anticuerpo unido se eluye mediante la adición de 35 µl de tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen). La mitad de la muestra se combina con un agente reductor de muestra NuPAGE® o se deja sin reducir, respectivamente, y se calienta durante 10 min a 70 °C. En consecuencia, se aplican 5-30 µl a 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (con tampón MOPS para SDS-PAGE no reducido y tampón MES con aditivo de tampón de desarrollo antioxidante NuPAGE® (Invitrogen) para SDS-PAGE reducida) y se tiñe con azul de Coomassie.

10 La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se mide cuantitativamente mediante cromatografía HPLC de afinidad. Brevemente, los sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpos y derivados que se unen a la proteína A se aplican a una columna Applied Biosystems Poros A/20 en KH₂PO₄ 200 mM, citrato de sodio 100 mM, pH 7,4 y se eluyen de la matriz con NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM, pH 2,5 en un sistema Agilent HPLC 1100. La proteína eluida se cuantifica por absorbancia UV y la integración de las áreas de pico. Un anticuerpo IgG1 estándar purificado sirvió como patrón.

15 Alternativamente, la concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se mide mediante Sandwich-IgG-ELISA. Brevemente, se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos con Estreptavidina StreptaWell High Bind (Roche) con 100 µl/pocillo de molécula de captura anti-IgG humana biotinilada F(ab')₂<h-Fcγ> BI (Dianova) a 0,1 µg/ml durante 1 h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante la noche a 4 °C y posteriormente se lavan tres veces con 200 µl/pocillo de PBS, 0,05% de Tween® (PBST, Sigma). Se añaden 100 µl/pocillo de una serie de diluciones en PBS (Sigma) de los sobrenadantes de cultivo de células que contienen los anticuerpos respectivos a los pocillos y se incuban durante 1-2 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo unido se detecta con 100 µl de F(ab')₂<h-Fcγ> POD (Dianova) a 0,1 µg/ml como anticuerpo de detección durante 1-2 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se elimina por lavado tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detecta mediante la adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se realiza en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

20 b) Para cada ml del volumen de producción final, se centrifugaron células viables 2.0 Mio (5 minutos a 210 xg). El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 100 uL de medio CD CHO. El ADN para cada ml de volumen de producción final se preparó mezclando 1 ug de ADN (ADN de la cadena ligera: ADN de cadena pesada = 1:1) en 100 uL de medio CD CHO. Después de la adición de 0,27 ul de solución de PEI (1 mg/ml), la mezcla se agitó con vórtex durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de 10 minutos, se pusieron juntas las células resuspendidas y la mezcla de ADN/PEI. Esta mezcla se transfirió entonces a un recipiente adecuado que se colocó en un dispositivo de agitación (37 °C, 5% CO₂). Después de un tiempo de incubación 3 horas, se añadieron 800 uL de medio F17, suplementado con 6 mM de L-glutamina, 1,25 mM de ácido valproico y 12,5% Pepsoy (50 g/L), por cada ml de volumen de producción final. Después de 24 horas se añadieron 70 uL de Feed (SF40, Lonza) por cada ml del volumen de producción final. Después de 7 días, o cuando la viabilidad celular era igual o menor que el 70%, las células se separaron del sobrenadante por centrifugación y filtración estéril.

Purificación de proteínas

45 a) Las proteínas se purifican a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados en referencia a protocolos estándar. De forma breve, los anticuerpos se aplican a una columna de Proteína A Sepharose (GE Healthcare) y se lavan con PBS. La elución de los anticuerpos se consigue a pH 2,8, seguido de neutralización inmediata de la muestra. La proteína agregada se separa de anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión de tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM pH 6,0. Las fracciones de anticuerpo monomérico se agrupan, concentran, si es necesario usando, por ejemplo, un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), congelan y almacenan a -20 °C. Parte de las muestras se proporcionan para los análisis de proteínas posteriores y caracterización analítica, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño o espectrometría de masas.

50 b) Los anticuerpos se purificaron mediante dos procedimientos de una etapa. El sobrenadante se cargó en una columna de proteína A, (proteína FF HiTrap (5 ml, GE Healthcare)), equilibrada con 6 CV de fosfato sódico 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Después de una etapa de lavado, el anticuerpo se eluyó de la columna mediante etapa de elución con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. Las fracciones apropiadas con anticuerpo eluido se neutralizaron por fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0 (1:10), se agruparon y se concentraron por centrifugación. El concentrado se esterilizó por filtración y se inyectó en una columna XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare). El tampón de formulación fue Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01%, pH 6,0. Las fracciones que contienen los monómeros se agruparon, se concentraron por centrifugación y se filtraron de forma estéril en un vial estéril. La determinación de la concentración se realizó por medición de la absorbancia a 280 nm, utilizando el valor teórico de la absorbancia de una solución al 0,1% del anticuerpo. Este valor se basa en la secuencia de aminoácidos.

65

SDS-PAGE

El sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se utilizan geles de NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast al 4% o 4-12% (pH 6,4) y un tampón NuPAGE® MES (geles reducidos, con aditivo de tampón antioxidante NuPAGE®) o MOPS (geles no reducido).

Cromatografía analítica de exclusión por tamaño

a) La cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación del estado de agregación y oligomérico de anticuerpos se realiza mediante cromatografía HPLC. Brevemente, se aplicaron anticuerpos purificados de proteína A a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema de HPLC Dionex. La proteína eluida se cuantifica por absorbancia UV y la integración de las áreas de pico. BioRad Gel Filtration Standard 151-1901 sirvió como patrón.

b) La pureza y contenido de monómero de la preparación de proteína final fueron determinados por CE-SDS (sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences) resp. HPLC (columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL ((Tosoh) en un fosfato de potasio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, azida sódica al 0,02% (p/v), tampón de pH 6,7.

Espectrometría de masas

La masa desglicosilada total de anticuerpos cruzados se determina y se confirma a través de espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS). Brevemente, se desglicosilan 100 µg de anticuerpos purificados con 50 mil N-glicosidasa F (PNGasa F, ProZyme) en KH₂PO₄/K₂HPO₄ 100 mM, pH 7 a 37 °C durante 12-24 horas a una concentración de proteína de hasta a 2 mg/ml y posteriormente se desalan por medio de HPLC en una columna de Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa de las respectivas cadenas pesadas y ligeras se determina por ESI-MS después de la desglicosilación y reducción. En resumen, 50 µg de anticuerpos en 115 µl se incuban con 60 µl de IM TCEP y 50 µl de clorhidrato de guanidina 8M posteriormente desalada. La masa total y la masa de las cadenas pesada y ligera reducidas se determinan mediante ESI-MS en un sistema MS Q-Star Elite equipado con una fuente NanoMate®.

Ejemplos**Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos anti-ROR1**

Las secuencias de proteínas de las regiones VH y VL de un anticuerpo de ROR1 de SEQ ID NOs: 2-9 se describen en WO2012/075158.

Brevemente, los oligonucleótidos que codifican las secuencias anteriores se unen entre sí a través de PCR para sintetizar ADNc que codifican las secuencias de VH y VL, respectivamente, del anticuerpo anti-ROR1.

Ejemplo 1A. Dominio extracelular de ROR1 humano, soluble, recombinante

El dominio extracelular de ROR1 humano, soluble, recombinante se produce como una proteína de fusión con el extremo C-terminal de Fc de IgG1 humana ("ROR1-ECD"). Brevemente, usando una PCR de extensión con empalme y solapamiento, se sintetiza un ADNc que codifica la proteína de fusión. El ADNc codifica, desde N-terminal a C-terminal, una proteína de fusión que consiste en una secuencia líder secretora, región bisagra, dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, un enlazador flexible con la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly Gly-Gly-Gly-Ser, (SEQ ID NO: 19) y los dominios extracelulares de ROR1 humano (residuos de aminoácidos 24 - 403). El ADNc se subclona en un vector de expresión de mamífero y la proteína de fusión recombinante se produce y purifica utilizando los mismos procedimientos que para los anticuerpos IgG1 humanos que se describen a continuación en el Ejemplo 2. La plantilla usada para la amplificación por PCR de la porción de ADNc que codifica el dominio extracelular de ROR1 humano es un clon de ADNc de gen de longitud completa humano EN1031_D08 ROR1 (Origene Technologies, Rockville, MD).

Una variante biotinilada de la misma fusión Fc-ROR1 ECD humana ("ROR1-ECD-biot") se produce como se describe anteriormente utilizando los mismos procedimientos con las siguientes modificaciones. Se añade una secuencia de ADN que codifica una etiqueta Avi-His, a través de la amplificación por PCR, en el marco en dirección 3' en el extremo 3' del primer producto de PCR descrito anteriormente. Este nuevo segundo producto de PCR se subclona a continuación en el vector de expresión de mamífero y después se cotransfecta en células de mamífero junto con un vector para la expresión de la enzima BirA para biotinilación in vivo de la etiqueta Avi. Durante el cultivo celular para la producción de ROR1-ECD-biot, el medio de cultivo celular se complementa con biotina para permitir la biotinilación adecuada. Las etapas de producción y purificación restantes se realizan como se ha indicado anteriormente para ROR1-ECD.

Ejemplo 1B. Células recombinantes que expresan ROR1 humano en su superficie

Las células recombinantes que expresan ROR1 humano en su superficie ("células HEK293-ROR1") se generan como se describe en el ejemplo 1A. El producto de amplificación se clona en un vector de expresión de E. coli, que comprende potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV), una polihistidina (6xHis), y un gen de resistencia a neomicina, se linealiza y se transfecta en células 293 de riñón embrionario humano (HEK293). Estas células se seleccionan que expresan ROR1 humano en su superficie y se eligen los clones estables de alta expresión mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia.

Ejemplo 1C. Línea de células B-CLL humanas o células primarias de B-CLL, línea celular de mieloma múltiple o línea celular de linfoma de células del manto que expresan ROR1 en su superficie

a) La línea celular de B-CLL humana EHEB fue adquirida de Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (ACC-67). Las células EHEB se cultivaron en DMEM, 10% de FCS, 1% de glutamina. La expresión de ROR1 en líneas de células de CLL EHEB se evaluó mediante citometría de flujo usando anticuerpos anti-ROR1 humano conjugados con fluorocromo (BD Biosciences). Se observó previamente que la expresión de ROR se expresaba en líneas de células de CLL EHEB (Daneshmanesh et al Leukemia 2012, 26 (6): 1348-1355).

b) Las células primarias de B-CLL humanas criopreservadas (CD19⁺ CD5⁺) se obtuvieron de Allcells (Alameda, CA, EE.UU.). Las células primarias de B-CLL de pacientes se obtuvieron legalmente y cumplen con los requisitos éticos: (i) la obtención de muestras de pacientes diagnosticados con CLL está aprobada por la Junta Revisora del Instituto (IRB) o el Comité de Sujetos Humanos; (ii) un consentimiento informado firmado y con testigos del paciente antes de tomar parte en el programa Allcells Diseased Cells; (iii) todos los pacientes con un diagnóstico de las enfermedades antes mencionadas son compensados razonablemente por su compromiso con el programa y la compensación ha sido aprobada por el IRB o el Comité de Sujetos Humanos; (iv) todos los pacientes son conscientes de que las muestras donadas se pueden usar para cualquier aplicación de investigación y renunciaron a sus derechos generados a partir de las aplicaciones de investigación.

Las células primarias de B-CLL fueron cultivadas en RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10%. La expresión de ROR1 en células primarias de B-CLL CD19⁺ CD5⁺ se confirmó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-ROR1 humanos conjugados con fluorocromo (véase el Ejemplo 1H).

c) La línea celular de mieloma múltiple de linfocitos B humanos RPMI8226 fue adquirida de ATCC (ATCC CCL-155). Las células de mieloma RPMI8226 se cultivaron en DMEM, FCS al 10%, glutamina al 1%. La expresión de ROR1 en líneas de células RPMI8226 se confirmó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-ROR1 humanos conjugados con fluorocromo (véase el Ejemplo 1H).

d) La línea celular Rec-1 de linfoma de células del manto humano (linfoma no Hodgkin de células B) fue adquirida de ATCC (ATCC CRL-3004). Las células Rec-1 se cultivaron en DMEM, FCS al 10%, glutamina al 1%. La expresión de ROR1 en líneas de células Rec-1 se confirmó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-ROR1 humanos conjugados con fluorocromo (véase el Ejemplo 1H).

Ejemplo 1D. Obtención de anticuerpos anti-ROR1 a través de la inmunización

Los anticuerpos anti-ROR1 se generan por inmunización de ratas con ECD de ROR1. Brevemente, se inmunizan ratas Sprague-Dawley por vía subcutánea con ECD de ROR1 (aminoácidos 5-54; NP_001183) conjugado con hemocianina de lapa californiana utilizando adyuvante TiterMax® (Sigma). La conjugación con la hemocianina de lapa californiana se realiza con un residuo de lisina usando Imject mcKLHV (Pierce). Debido a la alta homología de secuencia entre las proteínas ROR1 de ratón y humanos, las ratas son las preferidas para la producción de anticuerpos. Las células B se recogen de bazo inmunizado y se fusionan con células de mieloma P3-X63.Ag8 utilizando un protocolo estándar de fusión de polietilenglicol (Goding 1996; Monoclonal antibodies; principles and practice. Tercera ed Academic Press.). Los hibridomas se cultivan en medio de Dulbecco modificado por Iscove al 80% suplementado con clon fetal I al 10%, 4 mmol/l de L-glutamina, 10% de factores de clonación y que también incluye penicilina, estreptomina y 1 x hipoxantina de sodio, aminopterina y timidina. Las pruebas de ELISA se llevan a cabo para detectar la unión de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma a ROR1. Los hibridomas de unión a ROR1 positivos se criban adicionalmente mediante citometría de flujo para la unión basada en células a transfectantes de ROR1 (células HEK293-ROR1). Los hibridomas elegidos se someten a dos rondas de clonación por dilución limitante y se expanden adicionalmente para purificación. Además, los anticuerpos de esos mismos hibridomas elegidos se convierten en anticuerpos quiméricos con regiones constantes humanas mediante procedimientos estándar. Brevemente, los ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera se amplifican mediante RT-PCR de ARNm de los hibridomas y, a continuación, se unen en marco con ADNc que codifica la región constante pesada de Igg1 humana y la región constante de cadena ligera kappa humana, respectivamente. Estos ADNc se clonan en vectores de expresión transitoria de mamíferos y el ADN plasmídico se produce en E. coli y se purifican para la transfección. Las células HEK293 se transfectan mediante un procedimiento estándar de transfección (transfección a base de fosfato de calcio) y 7 días más tarde los anticuerpos IgG1 se purifican a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína A, seguido de aislamiento de la fracción de anticuerpo monomérico mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo IE. Obtención de anticuerpos anti-ROR1 de una biblioteca recombinante in vitro**Ejemplo 1E1. Construcción de bibliotecas de Fab genéricos**

Las bibliotecas de anticuerpos genéricos en formato Fab se construyen sobre la base de genes de la línea germinal humana usando los siguientes pares de dominio V: cadena ligera kappa Vk3_20 con cadena pesada VH3_23 para la biblioteca DP47-3 y la cadena ligera kappa Vk1_17 con cadena pesada VH1_69 para la biblioteca DP88-3. Ambas bibliotecas se asignan al azar en CDR3 de la cadena ligera (L3) y CDR3 de la cadena pesada (H3) y se ensamblan a partir de 3 fragmentos por biblioteca mediante PCR de corte y empalme por extensión con solapamiento (SOE). El fragmento 1 comprende el extremo 5' del gen del anticuerpo incluyendo L3 aleatorizado, el fragmento 2 es un fragmento constante centro que abarca desde L3 a H3, mientras que el fragmento 3 comprende H3 aleatorizado y la porción 3' del gen del anticuerpo. Las siguientes combinaciones de cebadores se utilizan para generar fragmentos de la biblioteca para la biblioteca DP47-3: fragmento 1 (LMB3-LibL1b_new), fragmento 2 (MS63-MS64), fragmento 3 (Lib2H-fdseqlong) (véase la tabla 1 de WO2012020038). Las siguientes combinaciones de cebadores se utilizan para generar fragmentos de la biblioteca para la biblioteca DP88-3: fragmento 1 (LMB3-RJH_LIB3), fragmento 2 (RJH31-RJH32) y fragmento 3 (LIB88_2-fdseqlong). Véanse las tablas 3 y 4 de WO2012020038.

El protocolo de PCR para la producción de fragmentos de biblioteca incluye: 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C; 25 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C y 1 min a 72 °C; y elongación terminal durante 10 min a 72 °C. Para la PCR de ensamblaje, se usan relaciones equimolares de los 3 fragmentos como plantilla. El protocolo de PCR de ensamblaje incluye: 3 min de desnaturalización inicial a 94 °C; y 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 min a 58 °C, y 2 min a 72 °C. En esta etapa, se añaden cebadores complementarios a los fragmentos fuera de la secuencia 1-3 y se realizan 20 ciclos adicionales antes de un alargamiento del terminal durante 10 min a 72 °C. Después del ensamblaje de cantidades suficientes de construcciones de Fab aleatorias de longitud completa, las construcciones Fab se digieren con NcoI/NotI para la biblioteca DP47-3 y con NcoI/NheI para la biblioteca DP88-3 junto con un vector fagémido aceptor tratado de forma similar. Para la biblioteca DP47-3, 22,8 µg de biblioteca de Fab se ligan con 16,2 µg de vector fagémido. Para la biblioteca DP88-3, 30,6 µg de biblioteca de Fab se ligan con 30,6 µg de vector fagémido.

Las ligaciones purificadas se utilizan para 68 transformaciones para la biblioteca DP47-3 y 64 transformaciones para la biblioteca DP88-3, respectivamente, para obtener las bibliotecas finales DP47-3 y DP88-3. Las partículas de fagémidos que expresan las bibliotecas de Fab se rescatan y se purificaron mediante purificación con PEG/NaCl para ser utilizadas para la selección de clones de Fab anti-ROR1.

Ejemplo 1E2. Selección de clones de Fab anti-ROR1

Las selecciones se llevan a cabo contra ROR1-ECD-biot. El antígeno está biotinilado in vivo después de la expresión. Las selecciones se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente protocolo: (i) unión de $\sim 10^{12}$ partículas de fagémido de biblioteca DP88-3 y 100 nM de ROR1-ECD-biot durante 0,5 horas en un volumen total de 1 ml; (ii) captura de ROR1-ECD-biot y fago unido por la adición de $5,4 \times 10^7$ perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina durante 10 min; (iii) lavado de perlas usando 5×1 ml PBS/Tween@20 y 5×1 ml de PBS; (iv) elución de las partículas de fago mediante la adición de 1 ml de TEA (trietilamina) 100 mM durante 10 minutos y neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris 1M/HCl pH 7,4; y (v) reinfección de las células TG1 de *E. coli* (Zymo Research) en fase logarítmica, infección con el fago auxiliar VCSM13 (Stratagene) y la posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido que se utilizará en rondas de selección posteriores.

Las selecciones se llevan a cabo durante 3 rondas utilizando concentraciones constantes de ROR1-ECD-biot a 100 nM. En la ronda 2, se realiza la captura de complejos de antígeno:fago en placas de neutravidina en lugar de perlas de estreptavidina. Los enlazadores específicos se identifican mediante ELISA de la siguiente manera usando: 100 µl de ROR1-ECD-biot 100 nM se recubre en cada pocillo de placas de neutravidina.

Se añaden sobrenadantes bacterianos que contienen Fab y se detectan los Fab de unión a través de sus etiquetas Flag mediante el uso de un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Una vez identificados, los clones de ECD anti-ROR1 se expresan en bacterias en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purifican por afinidad y caracterizan adicionalmente mediante análisis SPR usando un instrumento Biacore®.

Ejemplo 1F. Ensayos de unión a ROR1: resonancia de plasmón superficial

Para medir afinidades de unión de anticuerpo de ROR1 a ROR1 inmovilizado, se realizan mediciones de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore® 3000 (Pharmacia Biosensor). El receptor ROR1 (ROR1-ECD) se acopla al chip sensor a un nivel de 400 unidades de resonancia utilizando el protocolo de acoplamiento de amina proporcionado por el fabricante. ROR1-ECD-biot alternativo se acopla a un chip sensor con estreptavidina, también a un nivel de 400 unidades de resonancia, utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. En todos los experimentos, la celda de flujo 1 se utiliza como la celda de referencia. Se registran sensogramas para soluciones de Fab que van en concentraciones de 0,1 pM a 200 nM. Se utiliza un análisis de regresión no lineal para calcular las

constantes cinéticas y las constantes de unión de forma simultánea con el uso de software del fabricante. Los clones de Fab con afinidades de unión monovalentes a ROR1-ECD de ≤ 100 nM se convierten en IgG mediante procedimientos estándar. Brevemente, los ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen en el marco con ADNc que codifican la región constante pesada de IgG1 y la región constante de cadena ligera kappa humana, respectivamente. Estos ADNc se clonan en vectores de expresión transitoria de mamíferos y el ADN plasmídico se produce en *E. coli* y se purificaron para la transfección. Las células HEK293 se transfectan mediante un procedimiento estándar de transfección (transfección a base de fosfato de calcio) y 7 días más tarde los anticuerpos IgG1 se purifican a partir de sobrenadantes de cultivo por cromatografía de afinidad en una columna de proteína A, seguido de aislamiento de la fracción de anticuerpo monomérico mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo 1H. Unión a ROR1 en células HEK293-ROR1 o ROR1 unido a la placa, células primarias de B-CLL, células de mieloma RPMI8226 o células de MCL Rec-1 (citometría de flujo y/o ELISA)

a) Los anticuerpos anti-ROR1 que provienen del enfoque de inmunización y/o del cribado de la biblioteca recombinante in vitro descrita anteriormente se analizan mediante citometría de flujo para la unión a ROR1 humana en células HEK293-ROR1. Brevemente, se recogen las células cultivadas, se cuentan y se evalúa la viabilidad celular usando el procedimiento de exclusión de azul de tripano. Las células viables se ajustan a continuación a 2×10^6 células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). 90 μ l de esta suspensión celular a continuación se divide en alícuotas por pocillo en una placa de base redonda de 96 pocillos. Se añaden 10 μ l de los anticuerpos anti-ROR1 o control de IgG correspondiente a los pocillos que contienen células para obtener concentraciones finales de 0,1 pM a 200 nM. Todas las construcciones e IgG de control se utilizan en la misma molaridad. Después de la incubación durante 30 min a 4 °C, se centrifugan las células (5 min, 350 xg), se lavan con 150 μ l/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences), se resuspenden y se incuban durante 30 minutos adicionales a 4 °C con 12 μ l/pocillo de fragmento Fc γ específico de IgG anti-humana de cabra de fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado a fluorocromo (Jackson Immuno Research Lab; solución de trabajo: 1:20). Las células se lavan a continuación con el tampón de tinción (BD Biosciences) 120 μ l/pocillo y se sedimentan por centrifugación a 350 xg durante 5 min. Una segunda etapa de lavado se realiza utilizando tampón de tinción FACS 150 μ l/pocillo. Las muestras se resuspenden en 200 μ l/pocillo de tampón de tinción FACS y se adquieren y analizan usando un citómetro de flujo LSR II con software FACSDiva® (BD Biosciences). La intensidad de fluorescencia media (MFI) se representa como una función de la concentración de anticuerpos anti-ROR1 para obtener la curva de unión y para calcular la concentración de anticuerpos eficaz para alcanzar el 50% de la unión máxima (EC₅₀). Los anticuerpos anti-ROR1 que se unen a ROR1 en las células a juzgar por este ensayo se seleccionan para la siguiente etapa de cribado, a saber, el ensayo de internalización (etapa (Ejemplo 1I) a continuación).

Las propiedades de los anticuerpos que muestran unión a ROR1 humano en células HEK293-ROR1 se confirman usando un procedimiento ELISA convencional. Brevemente, se recubren placas de 96 pocillos de inmunosorción con 1,5 μ g/ml de GST-ROR1-ECD, se lavan con PBS + 1% de Tween (PBS-T) y se bloquean con PBS-T más 1% de albúmina de suero. Las placas recubiertas con ROR1 se incuban con sobrenadantes de cultivo de hibridoma durante 2 h a temperatura ambiente, se lavan 5 veces con PBS-T y se incuban con IgG de cabra anti-rata conjugada con peroxidasa. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las placas se lavan, se incuban con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y se detienen con un volumen igual de H₂SO₄ 1 mol/litro.

b) A continuación se evaluó la expresión de ROR1 en células CLL primarias CD19⁺ CD5⁺ mediante citometría de flujo. Brevemente, se recogieron las células, se lavaron, se contaron para la viabilidad, se resuspendieron a 50000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos de base redonda y se incubaron con anticuerpo anti-ROR1 humano marcado con Alexa488 a 10 μ g/ml durante 30 minutos a 4 °C (para evitar la internalización). Al final del tiempo de incubación, se centrifugaron las células (5 min a 350 xg), se lavaron dos veces con tampón FACS, se resuspendieron en 100 μ l de tampón FACS y se analizaron en un dispositivo Cantoll ejecutando el software Diva FACS. La figura 2A muestra un aumento de la intensidad de fluorescencia media tras la unión del anticuerpo anti-ROR1 a células de B-CLL primarias, lo que indica que ROR1 se expresa en células de CLL primarias.

c) Se evaluó a continuación la expresión de ROR1 en las líneas celulares RPMI8226 de mieloma de linfocitos B mediante citometría de flujo, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. La Figura 3 muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia media tras la unión de concentraciones crecientes del anticuerpo anti-ROR1 a las células RPMI8226, pero no a células MKN45 negativas de ROR1 (DSMZ ACC 409). La Tabla 1 muestra la CE50 de unión de anticuerpo anti-ROR1 a líneas celulares RPMI8226 positivas de ROR1.

Tabla 1: Valores de CE50 para la unión de anticuerpo anti-ROR1 a células RPMI8226

	Anticuerpo anti-ROR1
EC50 (nM)	0,087
EC50 (μg/ml)	0,013

d) La expresión de ROR1 también se analizó en líneas celulares MCL Rec-1 mediante citometría de flujo, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. La Figura 2B muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia media tras la unión del anticuerpo anti-ROR1 a las células MCL Rec-1.

Ejemplo 1I. Internalización de anticuerpo anti-ROR1 en la línea celular B-CLL EHEB o PBMC primarias de pacientes con CLL o células MM de RPMI8226 (citometría de flujo)

5 Los anticuerpos anti-ROR1 seleccionados en la etapa (Ejemplo 1H) anterior se ensayan adicionalmente en el ensayo de internalización. Brevemente, se descongelaron células primarias de B-CLL diana que expresan ROR1 humano crioconservadas, se recogieron con el tampón de disociación celular, se lavaron y se resuspendieron en RPMI suplementado con FCS al 10% a una concentración de 1×10^6 (1×10^6 /ml) de PBMC crioconservadas de pacientes con CLL no tratados o 2×10^6 células/ml de línea de células de B-CLL EHEB o 1×10^6 células/ml de células RPMI8226
 10 después de la determinación de la viabilidad celular usando ViCell. La suspensión celular se transfirió en un tubo Falcon de 15 ml para cada IgG/TCB probada y cada concentración. Se añadieron 0,5 ml de IgG anti-ROR1 o TCB anti-ROR1/anti-CD3 conjugados con Alexa488 (diluidos a 1 nM en RPMI + FCS al 10%) a los tubos y se incubaron durante 30 min en un espacio frío en un agitador. Después de la incubación y lavado de las células tres veces con PBS frío para eliminar el anticuerpo no unido, las células se dejaron en hielo o se transfirieron ($0,1 \times 10^6$ células) en
 15 placas FACS de 96 pocillos en medio precalentado y se incubaron a 37 °C durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, y 24 h para facilitar la internalización. Además, las muestras de células se incubaron a 37 °C durante 2 h y/o 24 h en presencia de óxido de fenilarsina 3 μ M (Sigma-Aldrich) para inhibir la internalización. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS frío y se incubaron con anticuerpo secundario de Fc (F(ab)2) anti-humano marcado con Alexa647 durante 30 min a 4 °C. Después de tres lavados finales con PBS, las células se centrifugaron 4 min a 400 xg y se resuspendieron en tampón FACS con o sin yoduro de propidio (1:4000) (Sigma). La intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células para IgG anti-ROR1 y TCB anti-ROR1/anti-CD3 se midió utilizando un citómetro de flujo FACS Cantoll (BD Biosciences) y el software analítico FlowJo

25 La reducción de MFI puede representar la internalización de anticuerpos, la disociación anticuerpo o una combinación de ambos. El porcentaje de reducción de MFI se calcula para cada anticuerpo de ROR1 en relación al control de IgG humana no específica (MFI_{fondo}) y anticuerpos de ROR1 mantenidos en hielo (MFI_{max}) mediante el uso de la fórmula $\Delta MFI = 100 - 100 \times [(MFI_{\text{experimental}} - MFI_{\text{fondo}}) / (MFI_{\text{max}} - MFI_{\text{fondo}})]$. Una reducción de la MFI que es bloqueada por el inhibidor de la endocitosis óxido de fenilarsina indica internalización de anticuerpos, mientras que una reducción de MFI que no es bloqueada por óxido de fenilarsina refleja la disociación del anticuerpo. La internalización de anticuerpos anti-ROR1 es conocida en el estado de la técnica (Baskar et al, Clin Cancer Res, 14 (2): 396-404 (2008)).

35 Para las terapias basadas en anticuerpos, tales como biespecíficos de células T, es importante que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para la diana tumoral no internalice, o se internalice lentamente, o se internalice ligeramente para facilitar una sinapsis inmune estable entre la célula tumoral y la célula T y una citotoxicidad redirigida mediante por células T efectiva. Por lo tanto, los anticuerpos anti-ROR1 seleccionados en la etapa (Ejemplo 1H) anterior que no se internaliza o se internaliza lentamente o se internaliza ligeramente se seleccionan para la siguiente etapa (Ejemplo 2) a continuación, a saber, la producción de anticuerpos anti-ROR1.

40 Los valores de internalización de anticuerpo Ig anti-ROR1 en células de CLL primarias y células RPMI8226 se resumen también en las figuras 4 y 6 y en las Tablas 4 y 6.

Ejemplo 2 - Producción de anticuerpos anti-ROR1

45 a) Los anticuerpos seleccionados que derivan de la inmunización están en un formato quimérico de rata-humano y a continuación se humanizan para poder aplicarlos para la terapia. En ese caso, los procedimientos estándar de humanización de anticuerpos se aplican mediante la transferencia de las regiones determinantes de complementariedad de las regiones variables de rata en las estructuras de región variable de anticuerpo humano. Las mutaciones adicionales se introducen en las regiones variables, si es necesario, para recuperar la unión a ROR1 en comparación con el anticuerpo quimérico, parental.

50 Para la producción del anticuerpo, las células se cotransfectan con dos plásmidos, (uno para la expresión de la cadena pesada del anticuerpo y otro para la expresión de la cadena ligera del anticuerpo), en una proporción de 1:1, respectivamente. Las células se cultivan como cultivos monocapa adherentes en matraces T utilizando medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10% y se transfectan cuando tienen una confluencia entre 50 y 80%. Para la transfección de un matraz T75, 8 millones de células se siembran 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (al 10% V/V final), 250 μ g/ml de neomicina y las células se colocan a 37 °C
 55 en una incubadora con una atmósfera del 5% de CO₂ durante la noche. Para cada matraz T75 a transfectar, una solución de ADN, CaCl₂ y agua se prepara mezclando 47 μ g de ADN vector plásmido total dividido por igual entre los vectores de expresión de cadena ligera y cadena pesada, 235 μ l de una solución 1 M de CaCl₂ y la adición de agua hasta un volumen final de 469 μ l. A esta solución, se añaden 469 μ l de una solución de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM a pH 7,05, se mezcla inmediatamente durante 10 segundos y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 20 s. La suspensión se diluye con 12 ml de DMEM suplementado con FCS al 2% y se añade a T75 en lugar del medio existente. Las células se incuban a 37 °C, 5% de CO₂ durante aproximadamente 17 a 20 horas, a continuación, el medio se reemplaza con 12 ml de DMEM, FCS al 10%. El medio de cultivo condicionado se recoge de 5 a 7 días después de la transfección, se centrifuga durante 5 min a 1200 rpm, seguido de una segunda
 65 centrifugación durante 10 min a 4000 rpm y se mantiene a 4 °C.

Los anticuerpos secretados se purifican mediante cromatografía de afinidad de Proteína A, seguido de cromatografía de intercambio catiónico y una etapa cromatográfica final por exclusión de tamaño en una columna de Superdex® 200 (Amersham Pharmacia) intercambiando el tampón por solución salina tamponada con fosfato y la recogida de los anticuerpos IgG1 monoméricos puros. La concentración de anticuerpo se estima utilizando un espectrofotómetro a partir de la absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos se formularon en una solución de fosfato de potasio 25 mM, cloruro sódico 125 mM, glicina 100 mM a pH 6,7.

b) Para la generación de vectores de expresión de anticuerpo anti-ROR1, las regiones variables de las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera se subclonaron en el marco con la cadena pesada constante de IgG1 o la cadena ligera constante de IgG1 humana preinsertadas en el respectivo vector de expresión receptor genérico optimizado para la expresión en líneas celulares de mamíferos. La expresión de anticuerpo es impulsada por un promotor MPSV quimérico que comprende un promotor de CMV y un promotor MPSV seguido de una UTR 5', un intrón y un elemento MAR de Ig kappa. La transcripción se termina por una secuencia sintética de señal poliA en el extremo 3' de las CDS. Todos los vectores llevan una secuencia de ADN de extremo 5' que codifica un péptido líder que reconoce proteínas para la secreción en células eucariotas. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de EBV para la replicación del plásmido episomal en células que expresan EBNA de EBV.

Ejemplo 3 - Generación de anticuerpos F(ab)₂ biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3

Ejemplo 3A. Generación de anticuerpos anti-CD3

Las siguientes secuencias de proteínas de las regiones VH y VL se utilizan para generar anticuerpos de CD3 ϵ reactivos de forma cruzada humanos y de mono cynomolgus, tal como se describe en WO2007/042261.

H2C_VH (SEQ ID NO: 7):

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNN
YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAY
WGQGLVTVSS

H2C_VL (SEQ ID NO: 8)

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG
TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL

Brevemente, los oligonucleótidos que codifican las secuencias anteriores se unen entre sí a través de PCR para sintetizar ADNc que codifican las secuencias de VH y VL, respectivamente, del anticuerpo anti-CD3.

Se utilizó el anticuerpo anti-CD3 CH2527 (SEQ ID NO: 21-28) para generar los anticuerpos biespecíficos de células T que fueron utilizados en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 3B. Generación de anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 en formato 1 + 1 (es decir, anticuerpo biespecífico (Fab) x (Fab) monovalente para ROR1 y monovalente para CD3) con o sin Fc

a) Un anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 que está desprovisto de una parte Fc tendría una ventaja de seguridad debido a la falta de posibilidad para inducir reacciones de infusión mediadas por Fc. Además, debido a la fuerte potencia de anticuerpos biespecíficos de células T en la destrucción de células diana in vitro (por ejemplo subnanomolar e incluso intervalo picomolar), es deseable que para los anticuerpos biespecíficos de células T específicos para una diana tumoral que también se expresa en células normales, tales como ROR1 en adipocitos humanos normales, los anticuerpos biespecíficos de células T podrían ser eliminados rápidamente de la circulación después de haber sido administrados. Los anticuerpos biespecíficos de células T desprovistos de un Fc tendrían una ventaja de seguridad y serían eliminados más rápidamente de la circulación en el caso de toxicidad.

Un anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 que contiene una parte Fc tendría la ventaja de una semivida de eliminación de aproximadamente 1 a 12 días, lo cual permite una administración de al menos una o dos veces por semana en comparación con los TCB sin una porción Fc (por ejemplo blinatumomab) que se requiere para administrarse por vía intravenosa y de forma continua con una bomba portada por los pacientes.

El anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 del formato 1 + 1 (es decir, anticuerpo biespecífico (Fab) x (Fab) monovalente para ROR1 y monovalente para CD3 con o sin Fc) se producen a partir de los anticuerpos anti-ROR1 humanos o humanizados seleccionados después de la etapa (Ejemplo 1). Los ADNc que codifican los Fab completos (dominios VH y CH1 de cadena pesada más dominios VL y CL de cadena ligera) de los anticuerpos IgG1

anti-ROR1 correspondientes, tal como se describe en el Ejemplo 1, así como los ADNc de VH y VL anti-CD3 descritos en el Ejemplo 3A, se utilizan como materiales de partida. Para cada anticuerpo biespecífico, cuatro cadenas de proteínas están implicadas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-ROR1 correspondiente y las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente, respectivamente, con o sin regiones Fc.

Brevemente, cada anticuerpo biespecífico se produce mediante cotransfección simultánea de tres vectores de expresión de mamífero que codifican, respectivamente: a) el ADNc de cadena ligera completa del anticuerpo de ROR1 correspondiente, b) un ADNc de fusión generado por procedimientos de biología molecular estándar, tales como PCR con empalme-solapamiento-extensión, que codifica una proteína de fusión fabricada de secuencia líder secretora (en orden N-terminal a C-terminal), Fab (VH seguido por los dominios CH1) del correspondiente anticuerpo anti-ROR1 descrito anteriormente, un enlazador de glicina-(Gly)-serina (Ser) flexible con la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, la VH del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente y el dominio kappa constante de un ADNc de cadena ligera humana, c) un ADNc de fusión generado por procedimientos estándar de biología molecular, tales como PCR de empalme-solapamiento-extensión, que codifican una proteína de fusión fabricada de secuencia líder secretora (en orden N-terminal a C-terminal), VL del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente, dominio CH1 constante de un ADNc de IgG1 humano. La cotransfección de células de mamífero y la producción y purificación de anticuerpos usando los procedimientos descritos anteriormente para la producción de anticuerpos IgG1 humanos o humanizados (véase el Ejemplo 2), con una modificación: para la purificación de anticuerpos, la primera etapa de captura no se realiza usando Proteína A, pero en cambio se realiza usando una columna de cromatografía de afinidad empaquetada con una resina de unión a la región constante de cadena ligera kappa humana, tal como KappaSelect (GE Healthcare Life Sciences). Además, puede incluirse un enlace disulfuro para aumentar la estabilidad y los rendimientos, así como residuos adicionales que forman puentes iónicos y que aumentan los rendimientos de heterodimerización (EP 1870459A1).

b) Para la generación de vectores de anticuerpos biespecíficos ROR1xCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos de dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y ROR1. Los restos de unión a antígeno son fragmentos Fab compuestos de una cadena pesada y una cadena ligera, que comprende cada una una región variable y una región constante. Al menos uno de los fragmentos Fab es un fragmento "Crossfab", en el que se intercambian los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab. El intercambio de los dominios constantes de cadena pesada y ligera dentro del fragmento Fab asegura que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tengan una disposición de dominios idénticos y por lo tanto no intercambien cadenas ligeras. El diseño de molécula biespecífica puede ser monovalente para ambos determinantes antigénicos (1 + 1) o monovalente para CD3 y bivalente para ROR1, donde un fragmento Fab está fusionado al extremo N-terminal del CrossFab interior (2 + 1). Puede ser que contenga Fc o que no contenga Fc con el fin de modular la semivida de la molécula. Una representación esquemática de las construcciones se proporciona en la Figura 1. Las secuencias de las construcciones se muestran en SEQ ID NOs 2 a 36. Las moléculas fueron producidas mediante cotransfección de las células HEK293 EBNA que crecen en suspensión con los vectores de expresión de mamífero utilizando polietilenimina (PEI). Para la preparación de construcciones CrossFab-IgG 1+1, las células fueron transfectadas con los vectores de expresión correspondientes en una relación 1:1:1:1 ("vector Fc(knob)": "vector cadena ligera": "vector cadena ligera CrossFab": "vector cadena pesada-CrossFab").

Ejemplo 3C. Generación del formato 2+1 biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 (es decir, anticuerpo biespecífico (Fab)₂ x (Fab) bivalente para ROR1 y monovalente para CD3) con o sin Fc

a) Un anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 con un formato 2 + 1, es decir anticuerpo biespecífico (Fab)₂ x (Fab) que es bivalente para ROR1 y monovalente para CD3 tendría ventajas sobre la potencia, la previsibilidad para la eficacia y la seguridad porque se uniría preferiblemente a la diana tumoral ROR1 y evitaría la depuración ("sink") del anticuerpo de CD3, por tanto, mayor probabilidad de que la exposición al fármaco se centre en el tumor. El anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 del formato 2 + 1 (es decir, anticuerpo biespecífico (Fab)₂ x (Fab) bivalente para ROR1 y monovalente para CD3 con o sin Fc se producen para los anticuerpos anti-ROR1 humanos o humanizados seleccionados después de la etapa (Ejemplo 1). Los ADNc que codifican los Fab completos (dominios VH y CH1 de cadena pesada más dominios VL y CL de cadena ligera) de los anticuerpos IgG1 anti-ROR1 correspondientes, tal como se describe en el Ejemplo 1, así como los ADNc de VH y VL anti-CD3 descritos en el Ejemplo 3A, se utilizan como materiales de partida. Para cada anticuerpo biespecífico, cuatro cadenas de proteínas están implicadas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-ROR1 correspondiente y las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente, respectivamente, con o sin regiones Fc. Brevemente, cada anticuerpo biespecífico se produce mediante cotransfección simultánea de tres vectores de expresión de mamífero que codifican, respectivamente: a) el ADNc de cadena ligera completa del anticuerpo de ROR1 correspondiente, b) un ADNc de fusión generado por procedimientos de biología molecular estándar, tales como PCR con empalme-solapamiento-extensión, que codifica una proteína de fusión fabricada de secuencia líder secretora (en orden N-terminal a C-terminal), Fab (VH seguido por los dominios CH1) del correspondiente anticuerpo anti-ROR1 descrito anteriormente, un enlazador de glicina-(Gly)-serina (Ser) flexible con la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Fab (VH seguido de dominios CH1) del correspondiente anticuerpo anti-ROR1 descrito anteriormente, un enlazador de glicina-(Gly)-serina (Ser) flexible con la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, la VH del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente y el dominio kappa constante de un ADNc de cadena ligera humana, c) un ADNc de fusión generado por procedimientos estándar de biología molecular, tales como PCR de empalme-solapamiento-extensión, que codifican una proteína de fusión fabricada de secuencia líder secretora (en

- orden N-terminal a C-terminal), VL del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente, dominio CH1 constante de un ADNc de IgG1 humano. La cotransfección de células de mamífero y la producción y purificación de anticuerpos usando los procedimientos descritos anteriormente para la producción de anticuerpos IgG1 humanos o humanizados (véase el Ejemplo 2), con una modificación: para la purificación de anticuerpos, la primera etapa de captura no se realiza usando Proteína A, pero en cambio se realiza usando una columna de cromatografía de afinidad empaquetada con una resina de unión a la región constante de cadena ligera kappa humana, tal como KappaSelect (GE Healthcare Life Sciences). Además, puede incluirse un enlace disulfuro para aumentar la estabilidad y los rendimientos, así como residuos adicionales que forman puentes iónicos y que aumentan los rendimientos de heterodimerización (EP 1870459A1).
- b) Para la generación de vectores de anticuerpos biespecíficos ROR1xCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos de dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y ROR1. Los restos de unión a antígeno son fragmentos Fab compuestos de una cadena pesada y una cadena ligera, que comprende cada una una región variable y una región constante. Al menos uno de los fragmentos Fab es un fragmento "Crossfab", en el que se intercambian los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab. El intercambio de los dominios constantes de cadena pesada y ligera dentro del fragmento Fab asegura que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tengan una disposición de dominios idénticos y por lo tanto no intercambien cadenas ligeras. El diseño de molécula biespecífica puede ser monovalente para ambos determinantes antigénicos (1 + 1) o monovalente para CD3 y bivalente para ROR1, donde un fragmento Fab está fusionado al extremo N-terminal del CrossFab interior (2 + 1). Puede ser que contenga Fc o que no contenga Fc con el fin de modular la semivida de la molécula. Una representación esquemática de las construcciones se proporciona en la Figura 1; las secuencias de las construcciones se muestran en SEQ ID NOs 1 a 36. Las moléculas fueron producidas mediante cotransfección de las células HEK293 EBNA que crecen en suspensión con los vectores de expresión de mamífero utilizando polietilimina (PEI). Para la preparación de construcciones CrossFab-IgG 2+1, las células fueron transfectadas con los vectores de expresión correspondientes en una relación 1:2:1:1 ("vector Fc(knob)": "vector cadena ligera": "vector cadena ligera CrossFab" : "vector cadena pesada-CrossFab").

Ejemplo 4 - Unión simultánea de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a ROR1 y CD3 (resonancia de plasmón superficial)

- Las propiedades de unión a ROR1 y CD3 de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 se analizan por la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un instrumento Biacore® T100 (Biacore AB) con HBS-EP como tampón de desarrollo (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensoactivo P20 al 0,005%, Biacore). Este sistema está bien establecido para el estudio de las interacciones de moléculas. Permite una monitorización continua en tiempo real de las uniones de ligando/analito y por tanto de la determinación de las constantes de velocidad de asociación (k_a), constantes de velocidad de disociación (k_d) y las constantes de equilibrio (KD) en varias configuraciones de ensayo. La tecnología SPR se basa en la medición del índice de refracción cerca de la superficie de un chip biosensor recubierto de oro. Los cambios en el índice de refracción indican los cambios de masa en la superficie causada por la interacción de ligando inmovilizado con el analito inyectado en solución. Si las moléculas se unen a ligando inmovilizado sobre la superficie, la masa aumenta, en el caso de la disociación, la masa disminuye.

- La captura de anticuerpo anti-etiqueta de His se inmoviliza sobre la superficie de un biosensorchip CM5 usando química de acoplamiento de amina. Las celdas de flujo se activan con una mezcla 1:1 de 0,1 M de N-hidroxisuccinimida y 0,1 M de 3-(N, N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida a un caudal de 5 ul/min de anticuerpo anti IgG humano inyectado en acetato de sodio, pH 5,0 a 10 ug/ml, lo que resultó en una densidad superficial de aproximadamente 12.000 unidades de resonancia (RU). Una celda de flujo de control de referencia se trató de la misma manera pero con tampones de vehículo sólo que en lugar del anticuerpo de captura. Las superficies se bloquearon con una inyección de etanolamina 1 M/HCl pH 8,5. Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 se diluyen en HBS-P y se inyectan a un caudal de 5 ul/min. El tiempo de contacto (fase de asociación) es 1 min para los anticuerpos a una concentración entre 1 y 100 nM para la unión ROR1-ECD y entre 1 y 200 nM para la interacción con CD3. ROR1-ECD se inyecta a concentraciones crecientes de 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 nM, CD3 en concentraciones de 0,21, 0,62, 1,85, 5,6, 16,7, 50, 100 y 200 nM. El tiempo de contacto (fase de asociación) es 3 min, el tiempo de disociación (lavado con tampón) 5 min para ambas moléculas a un caudal de 30 ul/min. Se realizan todas las interacciones a 25 °C (temperatura estándar). La solución de regeneración de cloruro de magnesio 3 M se inyecta durante 60 s a un flujo de 5 ul/min para eliminar cualquier proteína no unida covalentemente después de cada ciclo de unión. Las señales se detectan a una velocidad de una señal por segundo. Las muestras se inyectan a concentraciones crecientes. Se determinan los gráficos de SPR que muestran la velocidad de la señal (es decir, unidad de resonancia) representada contra tiempo de contacto.

Ejemplo 5 - Unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 para células de B-CLL positivas de ROR1 o células de mieloma o CD3 en las células T (citometría de flujo)

- a) Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 fueron también analizadas mediante citometría de flujo para sus propiedades de unión a ROR1 humano expresado en las células primarias de B-CLL o CD3 humano expresado en células T leucémicas humanas Jurkat (ATCC TIB-152). Las células T Jurkat se cultivaron en RPMI suplementado con suero de ternera fetal al 10%. Brevemente, se recogieron las células

cultivadas, se contaron y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a continuación a 2×10^6 células por ml en tampón de tinción FACS (BD Biosciences) que contenía BSA al 0,1%. 100 μ l de esta suspensión celular a continuación se dividieron en alícuotas por pocillo en una placa de base redonda de 96 pocillos. Se añadieron 30 μ l de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 marcados con Alexa488 o la IgG correspondiente de control en los pocillos que contenían células para obtener concentraciones finales de 3 nM a 500 nM o de 0,1 pM a 200 nM. Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 e IgG de control se utilizaron en la misma molaridad. Después de la incubación durante 30 min a 4 °C, se centrifugaron las células (5 min, 350 xg), se lavaron dos veces con 150 μ l/pocillo de tampón de tinción FACS que contenía BSA (BD Biosciences), a continuación, las células se fijaron con 100 μ l de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 120 μ l de tampón de FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. Se evaluó la unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a células B-CLL y las células T y la intensidad de fluorescencia media se determinó limitada células B-CLL que expresan ROR1 o células T Jurkat que expresan CD3 y se representó en histogramas o gráficos de puntos. La figura 7 muestra la intensidad de fluorescencia media para los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 que se unen a células T Jurkat y se representan gráficamente en función de la concentración de anticuerpo. No se alcanzaron valores de EC50 y la unión máxima de anticuerpos TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 a células Jurkat. Curiosamente, el anticuerpo TCB1+1 ROR1/anti-CD3 se une de manera más eficiente a las células T Jurkat que lo hace el anticuerpo TCB2+1 ROR1/anti-CD3. El anticuerpo de control de isotipo DP47 o anticuerpo IgG anti-ROR1 no se unieron a las células T Jurkat.

b) Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 se analizaron mediante citometría de flujo para la unión a ROR1 humano en células de mieloma RPMI8226 que expresan ROR1. MKN45 (línea celular de adenocarcinoma gástrico humano que no expresa ROR1) se utilizó como control negativo. Brevemente, se recogieron las células cultivadas, se contaron y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a continuación a 2×10^6 células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). 100 μ l de esta suspensión celular a continuación se dividió en alícuotas por pocillo en una placa de base redonda de 96 pocillos y se incubaron con 30 μ l de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 marcados con Alexa488 o la IgG correspondiente de control durante 30 min a 4 °C. Todos los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 (y control de isotipo) se titularon y se analizaron en un intervalo de concentración final de entre 0,25 y 100 nM. Para las muestras que utilizan anticuerpos no marcados, se centrifugaron las células (5 min, 350 xg), se lavaron con 120 μ l/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 minutos adicionales a 4 °C con fragmento Fc específico de IgG anti-humana de cabra de fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado a PE y conjugado a fluorocromo (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón de tinción (BD Biosciences), se fijaron utilizando 100 μ l de tampón de Fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 120 μ l de tampón de FACS y se analizaron utilizando BD FACS Cantoll. La figura 8 muestra la intensidad de fluorescencia media para los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 representada en función de la concentración de anticuerpo; (A) anticuerpos TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 en células RPMI8226, (B) anticuerpos TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 en células MKN45. Los valores de CE50 (que indica la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar el 50% de la unión máxima) para la unión de anticuerpos TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 a células RPMI8226 se resumen en la Tabla 3. Sorprendentemente, a pesar de ser monovalente a ROR1, el anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 parece unirse a las células de mieloma RPMI8226 positivas de ROR1 más eficientemente que el anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 que es bivalente a ROR1, detectado mediante FACS (Figura 8). También se observa que los anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 se unen a células primarias de B-CLL tal como se detecta mediante citometría de flujo usando un anticuerpo Fc anti-humano secundario conjugado a fluorocromo (Figura 2A).

Tabla 3: Valores de CE50 para la unión de anticuerpo biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a células RPMI8226

	Anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3	Anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3
EC50 (nM)	0,007	1,26
EC50 (μ g/ml)	0,007	0,24

Ejemplo 6. - La internalización de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en línea de células B-CLL EHEB o PBMC primarias de pacientes con CLL o células de MM RPMI8226 (citometría de flujo).

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 seleccionados en la etapa anterior (Ejemplo 5) se ensayó adicionalmente en el ensayo de internalización. Brevemente, se descongelaron células primarias de B-CLL diana que expresan ROR1 humano criopreservados, se recogieron con el tampón de disociación celular, se lavaron y se resuspendieron en RPMI suplementado con FCS al 10% a una concentración de 1×10^6 (1×10^6 /ml) de PBMC criopreservadas de pacientes con CLL no tratados o 2×10^6 células/ml de línea de células de B-CLL EHEB o 1×10^6 células/ml de células RPMI8226 después de la determinación de la viabilidad celular usando ViCell. La suspensión celular se transfirió en un tubo Falcon de 15 ml para cada IgG/TCB probado y cada concentración. Se

añadieron 0,5 ml de IgG anti-ROR1 o TCB anti-ROR1/anti-CD3 conjugados con Alexa488 (diluidos a 1 nM en RPMI + FCS al 10%) a los tubos y se incubaron durante 30 min en un espacio frío en un agitador. Después de la incubación y lavado de las células tres veces con PBS frío para eliminar el anticuerpo no unido, las células se dejaron en hielo o se transfirieron (0,1 x 10⁶ células) en placas FACS de 96 pocillos en medio precalentado y se incubaron a 37 °C durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, y 24 h para facilitar la internalización. Además, las muestras de células se incubaron a 37 °C durante 2 h y/o 24 h en presencia de óxido de fenilarsina 3 μM (Sigma-Aldrich) para inhibir la internalización. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS frío y se incubaron con anticuerpo secundario de Fc (F(ab)2) anti-humano marcado con Alexa647 durante 30 min a 4 °C. Después de tres lavados finales con PBS, las células se centrifugaron 4 min a 400 xg y se resuspendieron en tampón FACS con o sin yoduro de propidio (1:4000) (Sigma). La intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células para IgG anti-ROR1 y TCB anti-ROR1/anti-CD3 se midió utilizando un citómetro de flujo FACS Cantoll (BD Biosciences) y el software analítico FlowJo.

El término "reducción de la intensidad de fluorescencia media" (ΔMFI) que refleja la internalización de dicho anticuerpo anti-ROR1 a las células positivas de ROR1" o "reducción de MFI" como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de la reducción de MFI tal como se calcula para cada anticuerpo de ROR1 en relación al control de IgG humana no específica (MFI_{fondo}) y anticuerpos de ROR1 mantenidos en hielo (MFI_{max}) mediante el uso de la fórmula $\Delta MFI = 100 - 100 \times [(MFI_{\text{experimental}} - MFI_{\text{fondo}})/(MFI_{\text{max}} - MFI_{\text{fondo}})]$. Una MFI_{experimental} es la MFI medido con dicho anticuerpo de ROR1 después de la incubación de 2 horas a 37 °C. Una reducción de MFI puede representar la internalización de anticuerpos, la disociación de anticuerpos o una combinación de ambos. Una reducción de la MFI que es bloqueada por el inhibidor de la endocitosis óxido de fenilarsina indica la internalización de anticuerpos, mientras que una reducción de MFI que no es bloqueada por óxido de fenilarsina refleja la disociación del anticuerpo. La internalización de anticuerpos anti-ROR1 es conocida en el estado de la técnica (Baskar et al, Clin Cancer Res, 14 (2): 396-404 (2008)).

En algunos estudios, la tasa de internalización de anticuerpos de células T anti-CD3/anti-ROR1 se comparó con la del anticuerpo IgG bivalente anti-ROR1.

Para las terapias basadas en anticuerpos, tales como biespecíficos de células T, es importante que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para la diana tumoral no se internalice, o se internalice lentamente o se internalice ligeramente para facilitar una sinapsis inmune estable entre la célula tumoral y la célula T y una citotoxicidad redirigida mediada por células T eficaz y la activación de células T.

Como se muestra en las Figuras 4A y 4B y se resume en la Tabla 4, el anticuerpo IgG anti-ROR1 (1 nM) se internalizó aproximadamente el 12,5% en células primarias de B-CLL después de una incubación de 2 horas a 37 °C mientras que el anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 (1 nM) mostró un índice de internalización del 27,1% en células primarias de B-CLL en las mismas condiciones experimentales (Figuras 4A y 4C), medida mediante FACS (detección indirecta de anticuerpo conjugado a un fluorocromo secundario). La internalización se calculó basándose en el valor de MFI en el tiempo 0, la línea de base, y se calculó utilizando la fórmula descrita anteriormente. Los resultados muestran que TCB2+1anti-ROR1/anti-CD3 tiene un índice de internalización de menos del 30% en las células B-CLL.

La Figura 5 muestra la tasa de internalización de anticuerpo de TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 (1 nM) en células B-CLL primarias después de una incubación de 2 horas a 37 °C en presencia o ausencia de óxido de fenilarsina (PAO). Debido a que la reducción de la señal de MFI puede ser debida a la internalización y/o la disociación del anticuerpo, es importante verificar si una reducción de la señal de MFI es causada por la internalización o no mediante el uso de un inhibidor de la endocitosis para bloquear la internalización. Esto es particularmente importante para los anticuerpos monovalentes que tienen una avidéz de unión a las células inferior que los anticuerpos bivalentes. Como se muestra en la Figura 5, hubo una disminución del 91% en la señal de MFI en células primarias de B-CLL después de una incubación de 2 horas a 37 °C sin PAO. Sin embargo, cuando se incubaron las células de B-CLL en presencia de PAO (3 μM), aún se observó una disminución del 90% en la señal de MFI, lo que indica que la pérdida en la señal de MFI no era debida a la internalización del anticuerpo, sino probablemente a la disociación (Tabla 5). La tasa de internalización podría calcularse entonces como 0%. Los resultados demuestran que el TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 no internaliza en células de B-CLL, que es una característica preferida para un anticuerpo de TCB.

La Figura 6 y la Tabla 6 resumen las tasas de internalización de anticuerpos TCB2 +1 y anticuerpo IgG anti-ROR1 (1 nM) en las células de MM RPMI8226 después de una incubación de 2 horas a 37 °C, medidas en dos experimentos independientes. Los resultados demuestran que el TCB2 + 1 anti-ROR1/anti-CD3 tiene una tasa de internalización de menos del 15% en las células RPMI.

Tabla 4: Valores de internalización para anticuerpo biespecífico de células T 2+1 anti-ROR1/anti-CD3 e IgG de ROR1 en células de B-CLL primarias

	Internalización de anticuerpo anti-ROR1 (%)	Internalización de anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3
Tiempo 0	0 (línea base)	0 (línea base)
Tiempo 2 horas	12,5	27,1

Tabla 5: Valores de internalización para anticuerpo biespecífico de células T 1+1 anti-ROR1/anti-CD3 e IgG de ROR1 en células de B-CLL primarias

	Internalización de anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3
Tiempo 0	0 (línea base)
Tiempo 2 horas	0

Tabla 6: Valores de internalización para anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 e IgG de ROR1 en células de MM RPMI8226

Experimento 1	Internalización de anticuerpo anti-ROR1 (%)	Internalización de anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3
Tiempo 0	0 (línea base)	0 (línea base)
Tiempo 2 horas	0,7	8,6
Experimento 2	Internalización de anticuerpo anti-ROR1 (%)	Internalización de anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3
Tiempo 0	0 (línea base)	0 (línea base)
Tiempo 2 horas	0	11,8

Ejemplo 7 - Activación de las células T tras el acoplamiento de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 (citometría de flujo)

a) Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 T generados en el Ejemplo 3 fueron también analizados mediante citometría de flujo por su potencial para inducir la activación de células T mediante la evaluación de la expresión en la superficie del marcador de activación temprana CD69, o el macador de activación tardía CD25 en células T CD4⁺ y CD8⁺ en presencia o ausencia de células positivas de ROR1 humanas. Brevemente, se recogieron las células positivas de ROR1 con tampón de disociación celular, se contaron y la viabilidad celular se verificó usando ViCell. Las células viables de B-CLL se ajustaron a 0,2 x 10⁶ células/ml en RPMI suplementado con FCS al 10%, se pipetearon 100 µl de esta suspensión de células por pocillo en una placa de base redonda de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de las construcciones biespecíficas de células T a los pocillos que contienen células positivas de ROR1 para obtener una concentración final de 0,01 fM a 100 pM o de 0,01 pM a 100 nM. La placa de 96 pocillos se dejó de lado y se mantuvo a 37 °C, 5% de CO₂ hasta manipulaciones posteriores.

Se aislaron PBMC a partir de sangre fresca utilizando centrifugación en gradiente de densidad utilizando tubos de preparación celular con citrato de sodio (tubos Vacutainer CPT, BD Biosciences). Las células T humanas totales se aislaron a continuación utilizando el kit de aislamiento de células T Pan II (Miltenyi Biotec), según las instrucciones del fabricante. En algunos estudios, los clones de células T CD8 se usaron como efectoras. Se purificaron células T CD8 específicas para NLV (un péptido específico de CMV reconocido por HLA-A2) a partir de PBMCs de donantes sanos HLA-A2⁺ utilizando anticuerpos aCD8 y tetrámeros específicos para HLA-A2 en complejo con péptido NLV y clasificado con un clasificador de células. Las células purificadas se expandieron en preparaciones alimentadoras irradiadas obtenidas a partir de PBMC de donantes sanos y LCL (células linfoblastoides) HLA-A2⁺ pulsadas con péptido NLV en medios (RPMI1640 + FBS al 10% + L-glutamina al 1%) con 400 UI de IL-2. Los clones de células T CD8 específicas de NLV se mantuvieron en el mismo medio con 400 UI de IL-2 y se reactivaron periódicamente sobre preparaciones alimentadoras. Las células T humanas totales o clones de células T CD8 (efectoras) se ajustaron a continuación a 2 x 10⁶ células por ml en RPMI suplementado con FCS al 10%. Se añadieron 50 µl de esta suspensión de células por pocillo en la placa de ensayo que contenía ya las células diana positivas de ROR1 para obtener una relación final E:T de 3:1 (células T CD8 como efectoras) o 10:1 (PBMC como efectoras). Para probar si las construcciones biespecíficas de células T eran capaces de activar células T en presencia de solo células diana tumorales positivas de ROR1, también se incluyeron pocillos que contenían una concentración o concentraciones finales en el intervalo de 0,01 fM a 100 pM o de 0,01 pM a 100 nM de las respectivas moléculas biespecíficas con células efectoras pero sin células diana tumorales positivas de ROR1. Después de incubación durante 6 a 24 horas (clones de células T CD8 como efectoras) o de 24 a 48 horas (PBMC como efectoras) a 37 °C, 5% de CO₂, las células se sedimentaron por centrifugación (5 min, 350 xg) y se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences). La tinción de la superficie de las células efectoras con anticuerpos conjugados con fluorocromo seleccionados contra CD4, CD8, CD69 o CD25 humanos (BD Biosciences) se realizó a 4 °C durante 30 min, protegidos de la luz, en tampón de tinción FACS (BD Biosciences) de acuerdo con la el protocolo del fabricante. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS, se fijaron entonces usando 100 ul de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 120 µl de tampón FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. La expresión de los marcadores de activación CD69 o CD25 se determinó mediante la medición de la intensidad de fluorescencia media limitada a poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ como se representa en histogramas o gráficos de puntos.

La Figura 9A muestra el incremento dependiente de la concentración en la intensidad de fluorescencia media del marcador de activación tardía CD25 regulado en células T CD8. Los resultados indican que el anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 indujo una activación dependiente de la concentración significativa de células T CD8 en presencia de células Rec-1 positivas de ROR1 y se llegó a la señal máxima con 100 pM de anticuerpo. La activación no específica de células T CD8 fue mínima después de la unión de CD3 en las células T, pero sin unión en las células diana positivas de ROR1 obtenidas mediante construcciones de TCB no enlazantes. Aunque la activación de las células T CD8 no fue tan pronunciada con anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3, hubo un aumento débil pero perceptible en intensidad de fluorescencia media de CD25. Sin embargo, la activación inespecífica no se pudo descartar.

La Figura 9B muestra la regulación positiva dependiente de la concentración de CD25 en las células T CD8 mediada por anticuerpos TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3, en presencia de células de MM RPMI8226 positivas de ROR1. A la concentración más alta (100 pM) de anticuerpos TCB analizados no hubo activación no específica de células T CD8, tal como se muestra en comparación con construcciones de TCB no enlazantes.

Ejemplo 8 - Proliferación de células T tras el acoplamiento de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 (dilución en CFSE)

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan mediante citometría de flujo por su potencial para inducir la proliferación de células T CD8⁺ o CD4⁺ en presencia o ausencia de células positivas de ROR1 humanas. Brevemente, las células positivas de ROR1 se recogen con tampón de disociación celular, se cuentan y se busca la viabilidad utilizando azul de tripano. Las células viables de B-CLL se ajustan a $0,2 \times 10^6$ células por ml en medio completo RPMI, se pipetea 100 μ l de esta suspensión celular por pocillo en una placa de base redonda de 96 pocillos. Se añaden 50 μ l de las construcciones biespecíficas de células T a los pocillos que contienen células diana para obtener una concentración o concentraciones finales en el intervalo de 0,1 fM a 200 nM. La placa de pocillos se deja a un lado y se mantiene a 37 °C, 5% de CO₂.

Se aislaron PBMC a partir de sangre fresca utilizando centrifugación en gradiente de densidad utilizando tubos de preparación celular con citrato de sodio (tubos Vacutainer CPT, BD Biosciences). Las células T humanas totales se aislaron a continuación utilizando el kit de aislamiento de células T Pan II (Miltenyi Biotec), según las instrucciones del fabricante. Las células T totales se ajustaron a continuación a 1 millón de células por ml en RPMI precalentado sin suero (37 °C) y se tiñeron con CFSE 1 μ M a temperatura ambiente durante 6 min, protegido de la luz. El volumen de tinción se dobló a continuación mediante la adición de medio RPMI-1640 suplementado con FCS al 10% y GlutaMax al 1% para detener la tinción de CFSE. Después de la incubación a temperatura ambiente durante otros 20 min, las células se lavaron tres veces con medio que contenía suero precalentado para eliminar el CFSE restante. Las células T totales teñidas con CFSE (efectoras) se ajustaron entonces a 2×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 completo. Se añadieron 50 μ l de esta suspensión celular por pocillo en la placa de ensayo que ya contenía células positivas de ROR1 para obtener una relación final E:T de 5:1. Para probar si las construcciones biespecíficas de células T son capaces de activar células T solo en presencia de células diana tumorales positivas de ROR1, también se incluyen pocillos que contienen 1 nM de los anticuerpos biespecíficos de células T con células efectoras pero sin células diana tumorales. Después de la incubación durante cinco días a 37 °C, 5% de CO₂, las células se sedimentaron por centrifugación (5 min, 350 xg) y se lavaron dos veces con 150 μ l/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences). La tinción de la superficie de las células efectoras con anticuerpos conjugados con fluorocromo seleccionados contra CD4, CD8 o CD25 humanos (BD) se realizó a 4 °C durante 30 min, protegido de la luz, en tampón de tinción FACS de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se lavan dos veces con 150 μ l/pocillo de tampón de tinción FACS, se resuspendieron en 200 μ l/pocillo de tampón de tinción FACS, y se adquirieron y analizaron usando un citómetro de flujo LSR II complementado con software FACSDiva® (BD). El porcentaje de células no proliferantes se determina mediante limitación al extremo derecho del pico de CFSE sin diluir en el grupo que los pocillos contienen células positivas de ROR1 y células T teñidas con CFSE pero sin los anticuerpos biespecíficos de células T, y se compara con el de otros grupos experimentales (pozos). El porcentaje de células en proliferación se mide limitando a todos los picos CFSE diluidos, excluyendo el pico de más a la derecha (si observable). El nivel de proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ se determina por limitación a esa población primero, entonces se busca adicionalmente en los picos de dilución de CFSE.

Ejemplo 9 - Producción de citoquinas a partir de células T activadas tras el acoplamiento de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3

Ejemplo 9A. Producción de Interferón- γ

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan por su potencial para inducir la producción de interferón- γ (IFN- γ) por las células T en presencia o ausencia de células positivas de ROR1 humanas. Brevemente, las células positivas de ROR1 se recogen con tampón de disociación celular, se cuentan y se busca la viabilidad utilizando azul de tripano. Aproximadamente 20.000 células viables por pocillo se colocan en placas de base redonda de 96 pocillos y se añade la dilución de anticuerpo correspondiente para obtener la concentración o concentraciones finales en el intervalo de 0,1 pM a 200 nM. Las IgG anti-ROR1 y anti-CD3

humanas ajustadas a la misma molaridad se utilizan como controles. Se añaden células T efectoras totales humanas para obtener una relación final E:T de 5:1. Después de 20 h de incubación a 37 °C, 5% de CO₂, se miden los niveles de IFN- γ humanos en el sobrenadante mediante ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit II de ELISA de IFN- γ humana, BD Biosciences). Los niveles de IFN- γ producidos por las células T en presencia de anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 y de células positivas de ROR1 y se representan gráficamente en los histogramas y se comparan con los producidos por las células T en presencia de anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 pero sin células positivas de ROR1.

Ejemplo 9B. Ensayo de liberación de citoquinas (análisis de CBA)

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan por su potencial para inducir la producción de citoquinas mediada por células T en presencia o ausencia de células positivas de ROR1 humanas. Se aíslan PBMC de sangre fresca mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando tubos de preparación celular con citrato de sodio (tubos Vacutainer CPT, BD Biosciences) y se siembra una concentración final de células de 0,3 millones de células/pocillo en una placa de base redonda de 96 pocillos. A continuación se añaden células positivas de ROR1 para obtener una relación E:T de 10:1, así como construcciones biespecíficas de células T y se añaden controles de IgG para obtener una concentración o concentraciones finales en el intervalo de 0,1 a 200 nM, durante una incubación de 24 h a 37 °C, 5% de CO₂. El día siguiente, las células se centrifugan durante 5 min a 350 xg y el sobrenadante se transfiere a una nueva placa de 96 pocillos de pocillos profundos para el análisis ulterior. El análisis CBA se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante para citometría de flujo LSR II utilizando el kit de citoquinas Th1/Th2 humanas II (BD Biosciences), incluyendo IL-2 humana, IL-4 humana, IL-6 humana, IL-10 humana, TNF- α humano e IFN- γ humano. Los niveles de citoquinas producidas por las células T en presencia de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 y células positivas de ROR1 se miden y se representan en histogramas y se comparan con los producidos por las células T en presencia de anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 pero sin células positivas de ROR1.

Ejemplo 10 - Citotoxicidad de células T redirigida de células de B-CLL tras la reticulación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a CD3 en células T y ROR1 en células de B-CLL (ensayo de liberación de LDH)

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 se analizaron también por su potencial para inducir apoptosis mediada por células T en células de B-CLL que expresan ROR1 tras la reticulación de la construcción a través de la unión de los restos de unión a antígeno a ROR1 en las células. Brevemente, se descongelaron células diana primarias de B-CLL que expresaban ROR1 humano, se recogieron con tampón de disociación celular, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con FCS al 10%. Aproximadamente 30.000 células por pocillo se sembraron en una placa de base redonda de 96 pocillos y se añadió la dilución respectiva de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); variando las concentraciones finales de 0,01 fM a 100 pM o de 0,2 nM a 30 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones biespecíficas de células T y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células T totales humanas o clones de células T CD8 (efectores) en los pocillos para obtener una relación final E:T de 3:1. Cuando se usaron PBMC humanas como células efectoras, se usó una relación final E:T de 10:1. PHA-L (Sigma) se utilizó como control positivo para la activación de las células T humanas a una concentración de 1 μ g/ml. Los grupos de control negativos estuvieron representados por células efectoras o diana solas. Para la normalización, la lisis máxima de las células diana de B-CLL (= 100%) se determinó mediante incubación de las células diana con una concentración final de 1% de Triton X-100, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células diana coincubadas con células efectoras solas, es decir sin ningún anticuerpo biespecífico de células T. Después de 6 a 24 horas de incubación (clones de células T CD8 como efectores) o de 24 a 48 horas de incubación (PBMC como efectores) a 37 °C, 5% de CO₂, se midió entonces la liberación de LDH de las células diana apoptóticas/necróticas de B-CLL positivas de ROR1 en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se representó frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en las curvas de concentración-respuesta. Los valores IC₅₀ se midieron usando software Prism (GraphPad) y se determinó como la concentración de anticuerpo biespecífico de células T que da lugar al 50% de la liberación de LDH.

Ejemplo 11 - Citotoxicidad de células T redirigida de células de mieloma múltiple tras la reticulación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a CD3 en células T y ROR1 en células de mieloma múltiple (ensayo de liberación de LDH)

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 se analizaron también por su potencial para inducir apoptosis mediada por células T en células de mieloma múltiple que expresan ROR1 tras la reticulación de la construcción a través de la unión de los restos de unión a antígeno a ROR1 en las células. Brevemente, se recogieron células diana de mieloma múltiple RPMI-8226 que expresaban ROR1 humano (disponibles de la American Type Culture Collection; ATCC CCL-155) con tampón de disociación celular, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con FCS al 10%. Aproximadamente 30.000 células por pocillo se sembraron en una placa de base redonda de 96 pocillos y se añadió la dilución respectiva de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); variando las concentraciones finales de 0,01 fM a 100 pM o de 0,2 nM a

30 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones biespecíficas de células T y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células T totales humanas o clones de células T CD8 (efectores) en los pocillos para obtener una relación final E:T de 3: 1. Cuando se usaron PBMC humanas como células efectoras, se usó una relación final E:T de 10:1. PHA-L (Sigma) se utilizó como control positivo para la activación de las células T humanas a una concentración de 1 µg/ml. Los grupos de control negativos estuvieron representados por células efectoras o diana solas. Para la normalización, la lisis máxima de las células diana de mieloma múltiple RPMI-8226 (= 100%) se determinó mediante incubación de las células diana con una concentración final de 1% de Triton X-100, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células diana coincubadas con células efectoras solas, es decir sin ningún anticuerpo biespecífico de células T. Después de 6 a 24 horas de incubación (clones de células T CD8 como efectores) o de 24 a 48 horas de incubación (PBMC como efectores) a 37 °C, 5% de CO₂, se midió entonces la liberación de LDH de las células diana apoptóticas/necróticas positivas de ROR1 en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se representó frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en las curvas de concentración-respuesta. Los valores IC₅₀ se midieron usando software Prism (GraphPad) y se determinó como la concentración de anticuerpo biespecífico de células T que da lugar al 50% de la liberación de LDH.

La Figura 10 muestra la destrucción de células T redirigida de células diana de MM RPMI8226 positivas de ROR1 por células T CD8 activadas por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3. La citotoxicidad específica de las células diana (lisis tumoral) inducida por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 se midió mediante la liberación de LDH. (A) Experimento 1 (punto de tiempo 14 h): Se observó un aumento muy ligero dependiente de la concentración de la respuesta de lisis tumoral con anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3. Un 30% de lisis tumoral ya se observó con la concentración más baja ensayada de anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 0,01 pM y se alcanzó una lisis tumoral de hasta el 37,5% con 30 nM de anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en condiciones experimentales que reflejan relación E:T clínicamente relevante de 3:1 es decir, 3 células T CD8 para 1 célula diana RPMI 8226. EC₅₀ no se pudo calcular. La lisis tumoral del 37,5% observada a 30 nM, tal como se detecta mediante la liberación de LDH no podría haber atribuirse solamente a la destrucción no específica de células diana, ya que sólo había un 17% de lisis de células diana no específicas con 30 nM de TCB1 + 1 no enlazador (es decir, se une a células efectoras, pero no a células diana). Para anticuerpo TCB2 + 1 anti-ROR1/anti-CD3, una lisis máxima de células diana del 30% ya se observó en la concentración más baja ensayada de 0,2 fM y no hubo una respuesta dependiente de la concentración con concentraciones crecientes de hasta 10 nM. Sin embargo, la lisis celular con TCB 2 + 1 no enlazador en una concentración de 30 nM estaba ya cerca al 30%. (B) Experimento 2 (punto de tiempo de 20 h): El estudio se repitió en RPMI8226 positivas de ROR1 y la medición de la liberación de LDH se evaluó después de la incubación durante 20 h. Se observó un 30-40% de lisis de células diana con anticuerpos TCB1 + 1 y TCB2 + 1 anti-ROR1/anti-CD3 a una concentración de 100 pM, mientras que los controles de TCB no enlazadores a 100 pM no indujeron ninguna lisis tumoral. Los resultados concuerdan con un aumento en la activación de células T, medida por la regulación positiva del marcador CD25 en células T CD8 (Figura 9B).

Los resultados generales in vitro con células de cáncer de sangre positivas de ROR1 (CLL, MM y MCL) muestran claramente que las moléculas TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 actúan como anticuerpos biespecíficos de células T, ya que 1) se unen a células diana positivas de ROR1; 2) se unen a células T positivas de CD3; 3) median la activación de células T tras la unión simultánea a las células diana y las células T; y 4) inducir la citotoxicidad de células T redirigida de células diana positivas de ROR1 de una manera dependiente de la concentración que se corroboran con la regulación positiva de CD25 en las células T.

Ejemplo 12 - Citotoxicidad de células T redirigida de líneas celulares de tumores sólidos tras la reticulación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a CD3 en células T y ROR1 en células de tumores sólidos (ensayo de liberación de LDH)

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 se analizan también por su potencial para inducir apoptosis mediada por células T en células malignas de tumores sólidos (es decir, células diana) que expresan ROR1 tras la reticulación de la construcción a través de la unión de los restos de unión a antígeno a ROR1 en las células. Brevemente, se recogieron la línea de células de cáncer de pulmón A549 que expresan ROR-1 humanas (disponibles de la American Type Culture Collection; ATCC CCL-185) o la línea de células de cáncer de mama MDA-MB-468 (disponibles de la American Type Culture Collection; ATCC HTB-132) con tampón de disociación celular, se lavan y resuspenden en RPMI suplementado con FCS al 10%. Aproximadamente 30.000 células por pocillo se sembraron en una placa de base redonda de 96 pocillos y se añadió la dilución respectiva de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); variando las concentraciones finales de 0,1 fM a 200 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones biespecíficas de células T y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células T totales humanas (efectoras) en los pocillos para obtener una relación final E:T de 3:1. Cuando se usaron PBMC humanas como células efectoras, se usó una relación final E:T de 10:1. PHA-L (Sigma) se utilizó como control positivo para la activación de las células T humanas a una concentración de 1 µg/ml. Los grupos de control negativos estuvieron representados por células efectoras o diana solas. Para la normalización, la lisis máxima de células diana de línea celular de cáncer de pulmón A549 o línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468 (= 100%) se determinó mediante incubación de las células diana con una concentración final de 1% de Triton X-100,

induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células diana coincubadas con células efectoras solas, es decir sin ningún anticuerpo biespecífico de células T. Después de 20 horas de incubación a 37 °C, 5% de CO₂, se midió entonces la liberación de LDH de las células diana apoptóticas/necróticas positivas de ROR1 en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se representó frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en las curvas de concentración-respuesta. Los valores IC₅₀ se midieron usando software Prism (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo biespecífico de células T que da lugar al 50% de la liberación de LDH.

10 **Ejemplo 13 - Evaluación de la eficacia terapéutica de anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 en modelo de ratón beige SCID con xenoinjerto de CLL**

Se mantienen ratones beige inmunodeficientes combinados graves de CB17 (SCID) hembras adultas (Charles River Laboratories) en condiciones libres de patógenos específicos según las directrices. Se lleva a cabo un control de salud continuo de forma regular. Los ratones se monitorizan diariamente para síntomas clínicos y la detección de efectos adversos. Durante todo el período experimental, el peso corporal de los animales se registra dos veces por semana y el volumen del tumor se mide mediante el calibrador después de la estadificación. Los ratones CB17-SCID se reconstituyen primero con PBMC humanas a través de inyección en vena de cola y, a continuación, se inoculan por vía subcutánea en su dorso inferior con células B-CLL EHEB en 100 µl de PBS y 100 µl de matriz de la membrana basal Matrigel (Becton Dickinson). Cuando los tumores son palpables y alcanzan ~ 300 mm³, los ratones se asignan aleatoriamente en cohortes de 10 ratones cada uno y se tratan con ROR1-TCB 10-50 µg/ratón/dos veces a la semana administrado por vía intravenosa a través de la vena de la cola o una cantidad igual de control de IgG. Los animales se sacrifican, de acuerdo con las directrices institucionales, cuando el diámetro de sus tumores alcanza los 3 cm o cuando se observa toxicidad significativa. Se controlan el peso corporal del animal y cualquier signo de morbilidad.

25 **Ejemplo 14 - Evaluación de la eficacia terapéutica de anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 en el modelo de ratón de mieloma múltiple Vk*MYC**

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 T murinos con reactividad cruzada se ensayan para determinar su potencial para prevenir el mieloma múltiple en ratones propensos a mieloma múltiple Vk*MYC como se describe en Chesi, 2012 (Chesi et al 2012; Blood 120: 376-385). El mieloma múltiple es un tumor maligno hematológico que implica una expansión incontrolada de células plasmáticas en la médula ósea. Dado que ROR1 se expresa fuertemente en células plasmáticas malignas, se postula que un anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 será eficaz para el tratamiento de mieloma múltiple. El modelo de ratón de mieloma múltiple Vk*MYC es muy representativo de mieloma humano y predictivo de la respuesta al fármaco usado en la clínica; lo que representa una excelente herramienta para probar el concepto de prueba preclínica de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3. Brevemente, ratones Vk*MYC obtenidos a partir de una colaboración académica en la Mayo Clinic Arizona se cruzan con ratones transgénicos CD3ε humanos (Tg huCD3ε). Las células T de ratones Tg huCD3ε x Vk*MYC expresan tanto CD3ε humano como CD3ε de ratón en la superficie celular y los ratones son por lo tanto sensibles a anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3. Los ratones Vk*MYC uniformemente desarrollan una gammopatía monoclonal iniciada a alrededor de las 30 semanas de edad, que progresa lentamente con el tiempo asociada con signos clínicos representativos de mieloma humano, tales como anemia, osteoporosis y la enfermedad renal. Los ratones sangran periódicamente mediante raspado de la cola y se recoge la sangre en tubos Microtainer (BD Biosciences), se dejan coagular a temperatura ambiente y después se centrifugan durante 10 min a 2.300 g. Los sueros se diluyen 1:2 en tampón de solución salina normal y se analizan en un aparato de QuickGel Chamber usando QuickGels prefundidos (Helena Laboratories) según las instrucciones del fabricante. La relación de gamma/albúmina y fracciones de suero se miden mediante análisis densitométrico.

Para los estudios terapéuticos, se aceptan ratones Vk*MYC y se asignan al azar en diferentes grupos de tratamiento (n = 5-8/grupo): por ejemplo, 1) IgG de control; 2) anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3; 500 (µg/kg/semana o 10 µg/ratón/semana administrado por vía intravenosa a través de la vena de la cola; 3) bortezomib 1 mg/kg/i.p. en los días 1,4,8,11 utilizado como patrón de cuidado. Preferiblemente, la dosis o las dosis de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 podrían ser múltiples y variar entre 200 y 1.000 µg/kg/semana. En cada grupo, había al menos tres ratones Vk*MYC (> 1 año de edad) con una relación gamma/albúmina entre 0,3-2,0, correspondiente a un pico M predominante entre aproximadamente 10-70 g/l, medido por densitometría. Se realiza una electroforesis de proteínas séricas (SPEP) en el día 0 y día 14 después de tratamiento para medir la reducción mediada por tratamiento en el pico M como un marcador de la respuesta tumoral, tal como se hace en la clínica. En algunos estudios terapéuticos, los ratones Vk*MYC trasplantados con un pico M de aproximadamente 10-70 g/l y una plasmocitosis de médula ósea mayor que 5% se aceptan y asignan a diferentes grupos de tratamiento. Se evalúa la eficacia de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 para reducir el pico M.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ENGMAB AG

65 <120> Anticuerpos biespecíficos contra CD3É233 y ROR1

<150> EP13001840.1
<151> 09/04/2013
<160> 36
<170> BISSAP 1.2
<210> 1
<211> 937
<212 > PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	Met	His	Arg	Pro	Arg	Arg	Arg	Gly	Thr	Arg	Pro	Pro	Leu	Leu	Ala	Leu
	1				5					10					15	
5	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Thr
				20					25					30		
	Glu	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	Glu	Leu	Val	Pro	Thr	Ser	Ser	Trp	Asn	Ile
			35					40					45			
10	Ser	Ser	Glu	Leu	Asn	Lys	Asp	Ser	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asp	Glu	Pro	Met
	50						55						60			
	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Ser	Leu	Gly	Gln	Thr	Ala	Glu	Leu	His	Cys	Lys
	65					70					75					80
15	Val	Ser	Gly	Asn	Pro	Pro	Pro	Thr	Ile	Arg	Trp	Phe	Lys	Asn	Asp	Ala
				85						90					95	
	Pro	Val	Val	Gln	Glu	Pro	Arg	Arg	Leu	Ser	Phe	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr
				100					105					110		
20	Gly	Ser	Arg	Leu	Arg	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Thr	Thr	Asp	Thr	Gly	Tyr
			115					120					125			
	Phe	Gln	Cys	Val	Ala	Thr	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	Val	Ser	Ser	Thr	Gly
	130						135						140			
25	Val	Leu	Phe	Val	Lys	Phe	Gly	Pro	Pro	Pro	Thr	Ala	Ser	Pro	Gly	Tyr
	145					150						155				160
	Ser	Asp	Glu	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Cys	Gln	Pro	Tyr	Arg	Gly	Ile
				165						170					175	
30	Ala	Cys	Ala	Arg	Phe	Ile	Gly	Asn	Arg	Thr	Val	Tyr	Met	Glu	Ser	Leu
				180					185					190		
	His	Met	Gln	Gly	Glu	Ile	Glu	Asn	Gln	Ile	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr	Met
			195					200					205			
35	Ile	Gly	Thr	Ser	Ser	His	Leu	Ser	Asp	Lys	Cys	Ser	Gln	Phe	Ala	Ile
	210						215					220				
	Pro	Ser	Leu	Cys	His	Tyr	Ala	Phe	Pro	Tyr	Cys	Asp	Glu	Thr	Ser	Ser
	225					230						235				240
40	Val	Pro	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Cys	Arg	Asp	Glu	Cys	Glu	Ile	Leu	Glu
				245						250					255	
	Asn	Val	Leu	Cys	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ile	Phe	Ala	Arg	Ser	Asn	Pro	Met
				260						265					270	
45	Ile	Leu	Met	Arg	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Cys	Glu	Asp	Leu	Pro	Gln	Pro
			275					280					285			
	Glu	Ser	Pro	Glu	Ala	Ala	Asn	Cys	Ile	Arg	Ile	Gly	Ile	Pro	Met	Ala
	290						295					300				
50	Asp	Pro	Ile	Asn	Lys	Asn	His	Lys	Cys	Tyr	Asn	Ser	Thr	Gly	Val	Asp
	305					310					315					320
	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Ser	Gly	Arg	Gln	Cys	Gln	Pro
				325						330					335	
55	Trp	Asn	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Thr	His	Thr	Phe	Thr	Ala	Leu	Arg	Phe

				340					345				350			
	Pro	Glu	Leu	Asn	Gly	Gly	His	Ser	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Gly	Asn	Gln
				355					360				365			
	Lys	Glu	Ala	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	Ser	Asp
				370					375				380			
5	Leu	Cys	Asp	Ile	Pro	Ala	Cys	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Lys	Glu	Lys	Asn
				385					390				395			400
	Lys	Met	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Leu	Val	Pro	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Leu
				405					410				415			
10	Ala	Ile	Ala	Leu	Phe	Phe	Phe	Ile	Cys	Val	Cys	Arg	Asn	Asn	Gln	
				420					425				430			
	Lys	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Val	Gln	Arg	Gln	Pro	Lys	His	Val	Arg	Gly
				435					440				445			
	Gln	Asn	Val	Glu	Met	Ser	Met	Leu	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Lys	Ser	Lys
				450					455				460			
15	Ala	Lys	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Val	Arg	Phe	Met	Glu	Glu	Leu	Gly
				465					470				475			480
	Glu	Cys	Ala	Phe	Gly	Lys	Ile	Tyr	Lys	Gly	His	Leu	Tyr	Leu	Pro	Gly
				485					490				495			
20	Met	Asp	His	Ala	Gln	Leu	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Asn
				500					505				510			
	Asn	Pro	Gln	Gln	Trp	Thr	Glu	Phe	Gln	Gln	Glu	Ala	Ser	Leu	Met	Ala
				515					520				525			
	Glu	Leu	His	His	Pro	Asn	Ile	Val	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Gln
				530					535				540			
25	Glu	Gln	Pro	Val	Cys	Met	Leu	Phe	Glu	Tyr	Ile	Asn	Gln	Gly	Asp	Leu
				545					550				555			560
	His	Glu	Phe	Leu	Ile	Met	Arg	Ser	Pro	His	Ser	Asp	Val	Gly	Cys	Ser
				565					570				575			
30	Ser	Asp	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Leu	Asp	His	Gly	Asp	Phe
				580					585				590			
	Leu	His	Ile	Ala	Ile	Gln	Ile	Ala	Ala	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ser	Ser
				595					600				605			
35	His	Phe	Val	His	Lys	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Ile	Gly	
				610					615				620			
	Glu	Gln	Leu	His	Val	Lys	Ile	Ser	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Glu	Ile
				625					630				635			640
	Tyr	Ser	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Val	Gln	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Pro	Ile
				645					650				655			
40	Arg	Trp	Met	Pro	Pro	Glu	Ala	Ile	Met	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ser	Ser	Asp
				660					665				670			
	Ser	Asp	Ile	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser	Ser	Phe
				675					680				685			
45	Gly	Leu	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Ser	Asn	Gln	Glu	Val	Ile	Glu	Met
				690					695				700			
	Val	Arg	Lys	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Cys	Ser	Glu	Asp	Cys	Pro	Pro	Arg
				705					710				715			720
	Met	Tyr	Ser	Leu	Met	Thr	Glu	Cys	Trp	Asn	Glu	Ile	Pro	Ser	Arg	Arg
				725					730				735			
50	Pro	Arg	Phe	Lys	Asp	Ile	His	Val	Arg	Leu	Arg	Ser	Trp	Glu	Gly	Leu
				740					745				750			
	Ser	Ser	His	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly	Asn	Ala	Thr	Thr
				755					760				765			
55	Gln	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Ser	Asn	Leu	Ser	Asn	Pro
				770					775				780			
	Arg	Tyr	Pro	Asn	Tyr	Met	Phe	Pro	Ser	Gln	Gly	Ile	Thr	Pro	Gln	Gly
				785					790				795			800
	Gln	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Gly	Pro	Pro	Ile	Pro	Gln	Asn	Gln	Arg	Phe
				805					810				815			
60	Ile	Pro	Ile	Asn	Gly	Tyr	Pro	Ile	Pro	Pro	Gly	Tyr	Ala	Ala	Phe	Pro
				820					825				830			
	Ala	Ala	His	Tyr	Gln	Pro	Thr	Gly	Pro	Pro	Arg	Val	Ile	Gln	His	Cys
				835					840				845			

65

5 Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser
 850 855 860
 Thr Gly His Val Thr Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala
 865 870 875 880
 Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly
 885 890 895
 10 Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
 900 905 910
 Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His
 915 920 925
 15 Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Leu
 930 935

20 <210> 2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 2

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

45 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 50 < 400> 3

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

60 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 4

65 Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 5

5

Gly Ala Asp Tyr Ile Gly Gly Tyr Val
1 5

10

<210> 6
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 6

15

20

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

40

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 7

45

Ala Tyr Tyr Met Ser
1 5

50

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 < 213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 8

55

60

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

65

ES 2 748 339 T3

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 9

5

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

10

<210> 10
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 10

15

20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

40

<210> 11
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11

45

50

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

65

5
 10
 15
 20

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr
			20						25					30	
Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40						45		
Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr
65					70					75					80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
				85					90					95	
Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe
			100					105						110	
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120						125		

25
 <210> 22
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 22

30
 35
 40
 45

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

50
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 23

55
 Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5

60
 <210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 65 <213> Mus musculus

<400> 24

5 **Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser**
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

10 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 25

15 **His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr**
 1 5 10

20 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 26

25

30 **Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn**
 1 5 10

35 <210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27

40 **Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro**
 1 5

45 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 28

50

55 **Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val**
 1 5

60 <210> 29
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 29

65

5 Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly
 1 5 10
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val
 50 55 60
 10 Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Asp
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Arg Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 15 Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile Trp Gly
 100 105 110
 Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 20 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 25 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 30 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 35 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 40 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 45 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 50 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 55 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 60 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 65 Pro Gly Lys
 450

ES 2 748 339 T3

<210> 30
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 30

5

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

45

<210> 31
 <211> 694
 <212> PRT
 <213 > Mus musculus
 <400> 31

50

55

60

65

	Gln	Glu	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
5	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ala	Tyr
				20					25					30		
	Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
10	Ala	Thr	Ile	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Trp	Val
		50					55					60				
	Asn	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Asn	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Asp
	65					70					75					80
15	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
				85						90					95	
	Ala	Arg	Asp	Ser	Tyr	Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Leu	Phe	Asn	Ile	Trp	Gly
				100					105					110		
20	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
			115					120					125			
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
		130					135					140				
25	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
	145					150					155					160
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165						170					175	
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																

	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
				180					185					190		
5	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
			195					200					205			
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
		210					215					220				
	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu
	225					230					235					240
10	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
						245				250					255	
	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val
				260					265					270		
15	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser
				275				280					285			
	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
		290					295					300				
	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met
	305					310					315					320
20	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His
					325						330					335
	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
				340						345				350		
25	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser
				355					360					365		
	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
	370						375					380				
	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
	385					390					395					400
30	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val
				405						410					415	
	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu
				420					425					430		
35	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				435				440					445			
	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
		450					455					460				
	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	465					470					475					480
40	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
					485					490						495
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				500					505					510		
45	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			515				520						525			
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
		530					535					540				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	545					550					555					560
50	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly
					565					570						575
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				580					585					590		
55	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
				595					600					605		
	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		610					615					620				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	625					630					635					640
60	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
					645						650					655
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				660					665					670		
65	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu

675 680 685
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690

5

10 <210> 32
<211> 451
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 32

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5 Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly
 1 5 10
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10 Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val
 50 55 60
 Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Asp
 65 70 75 80
 15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Arg Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile Trp Gly
 100 105 110
 Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 20 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 25 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 30 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 35 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 40 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 45 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 50 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 55 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 60 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 65 Pro Gly Lys
 450

<210> 33
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 33

5

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

45 <210> 34
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 34

50

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

				100					105				110			
	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
5				115				120					125			
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
		130						135					140			
	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
10	145					150					155					160
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
					165					170						175
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
15					180					185						190
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
								200					205			
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
20		210					215					220				
	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu
	225					230					235					240
	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
25					245					250						255
	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val
					260				265					270		
	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser
30								280						285		
	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
		290					295					300				
	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met
35	305					310					315					320
	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His
					325						330					335
	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
40					340					345						350
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
								360					365			
	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
45		370					375					380				
	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
	385					390					395					400
	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val
50					405					410						415
	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu
					420				425							430
	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
55								440					445			
	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
		450					455						460			
60	Gly	Glu	Cys													
	465															

ES 2 748 339 T3

<210> 35
 <211> 702
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 35

5

	Gln	Glu	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
10	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ala	Tyr
				20					25					30		
	Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
15			35					40					45			
	Ala	Thr	Ile	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Trp	Val
		50					55						60			

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	Asn	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Asn	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Asp
	65					70					75					80
5	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
					85					90					95	
	Ala	Arg	Asp	Ser	Tyr	Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Leu	Phe	Asn	Ile	Trp	Gly
				100					105					110		
10	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
			115					120					125			
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
		130					135					140				
	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
	145				150						155				160	
15	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165						170					175	
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
				180					185					190		
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
			195					200					205			
20	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
		210					215					220				
	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Glu	Gln	Leu	Val
	225				230						235				240	
	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro	Gly	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	
				245						250				255		
25	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Met	Ser	Trp	Val
				260				265						270		
	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Ala	Thr	Ile	Tyr	Pro
			275					280					285			
30	Ser	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Trp	Val	Asn	Gly	Arg	Phe	Thr
		290					295					300				
	Ile	Ser	Ser	Asp	Asn	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Asp	Leu	Gln	Met	Asn	Ser
	305				310						315				320	
	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Tyr
				325						330				335		
35	Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Leu	Phe	Asn	Ile	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val
				340					345					350		
	Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			355					360					365			
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
							375					380				
40	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	385					390					395					400
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				405						410					415	
45	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				420					425					430		
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			435					440					445			
	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly
		450					455					460				
50	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
	465					470					475					480
	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
				485						490					495	
55	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
				500					505					510		
	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr
			515					520					525			
	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg
			530				535					540				
60	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala
	545				550						555					560
	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn

65

5 Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 580 585 590
 Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 595 600 605
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 610 615 620
 10 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 625 630 635 640
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 645 650 655
 15 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 660 665 670
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 675 680 685
 20 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690 695 700

25 <210> 36
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 36

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3 ϵ humanas y al dominio extracelular de ROR1 humano (ROR1), en el que el anticuerpo biespecífico tiene la construcción Fab de ROR1 - Fc – Fab de CD3 – Fab de ROR1.
2. Anticuerpo biespecífico, según la reivindicación 1, en el que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 del Fab de CD3 se sustituyen uno por el otro.
- 10 3. Anticuerpo biespecífico, según la reivindicación 1 o 2, en el que los dominios variables VL y VH del Fab de CD3 se sustituyen uno por el otro.
- 15 4. Anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo no se internaliza a una concentración de 1 nM en un ensayo usando células primarias de B-CLL positivas de ROR1 a 37 °C durante dos horas, en el que no internaliza significa que la intensidad de fluorescencia media detectada mediante citometría de flujo de la unión del anticuerpo a tiempo 0 no se reduce en más de un 50%, preferiblemente no más del 30%, cuando se volvió a medir después de una incubación de dos horas a 37 °C.
- 20 5. Anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el Fab de CD3 comprende las CDR de SEQ ID NO: 12, 13 y 14, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las CDR de SEQ ID NO: 15, 16 y 17, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, opcionalmente en el que el Fab de CD3 comprende el dominio variable VH de SEQ ID NO: 10 y el dominio variable VL de SEQ ID NO: 11.
- 25 6. Anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el Fab de CD3 comprende las CDR de SEQ ID NO: 23, 24 y 25 que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y las CDR de SEQ ID NO: 26, 27 y 28 que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, opcionalmente en el que el Fab de CD3 comprende el dominio variable VH de SEQ ID NO: 21 y el dominio variable VL de la SEQ ID NO: 22.
- 30 7. Anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada Fab de ROR1 comprende las CDR de SEQ ID NO: 7, 8 y 9 que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y las CDR de la SEQ ID NO: 3, 4 y 5 que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera.
- 35 8. Anticuerpo biespecífico, según la reivindicación 1, en el que la construcción consiste en los bloques de construcción SEQ ID NO: 30 (2x), 31, 32, y 33.
- 40 9. Procedimiento para la preparación del anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas de transformar una célula huésped con uno o más vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos y/o fragmentos respectivos y cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y recuperar dicho molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.
- 45 10. Célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 50 11. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 12. Anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición farmacéutica, según la reivindicación 11, para usar como medicamento.
- 60 13. Anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición farmacéutica, según la reivindicación 11, para usar como medicamento en el tratamiento de un tumor maligno hematológico positivo de ROR1 seleccionado de leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal (MZL), linfoma de células B grandes difusas (DLBCL), mieloma múltiple (MM) y linfoma folicular (FL).
- 65 14. Anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición farmacéutica, según la reivindicación 11, para usar como medicamento en el tratamiento de un tumor sólido positivo de ROR1, opcionalmente en el que el tumor positivo de ROR1 es cáncer de mama o cáncer de pulmón.
15. Anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición farmacéutica, según la

reivindicación 11, para usar como medicamento en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de linaje de células B (B-CLL) o trastorno de células plasmáticas, opcionalmente en el que el trastorno de células plasmáticas es el mieloma múltiple (MM) u otro trastorno de células B que expresan ROR1.

Fig. 1.

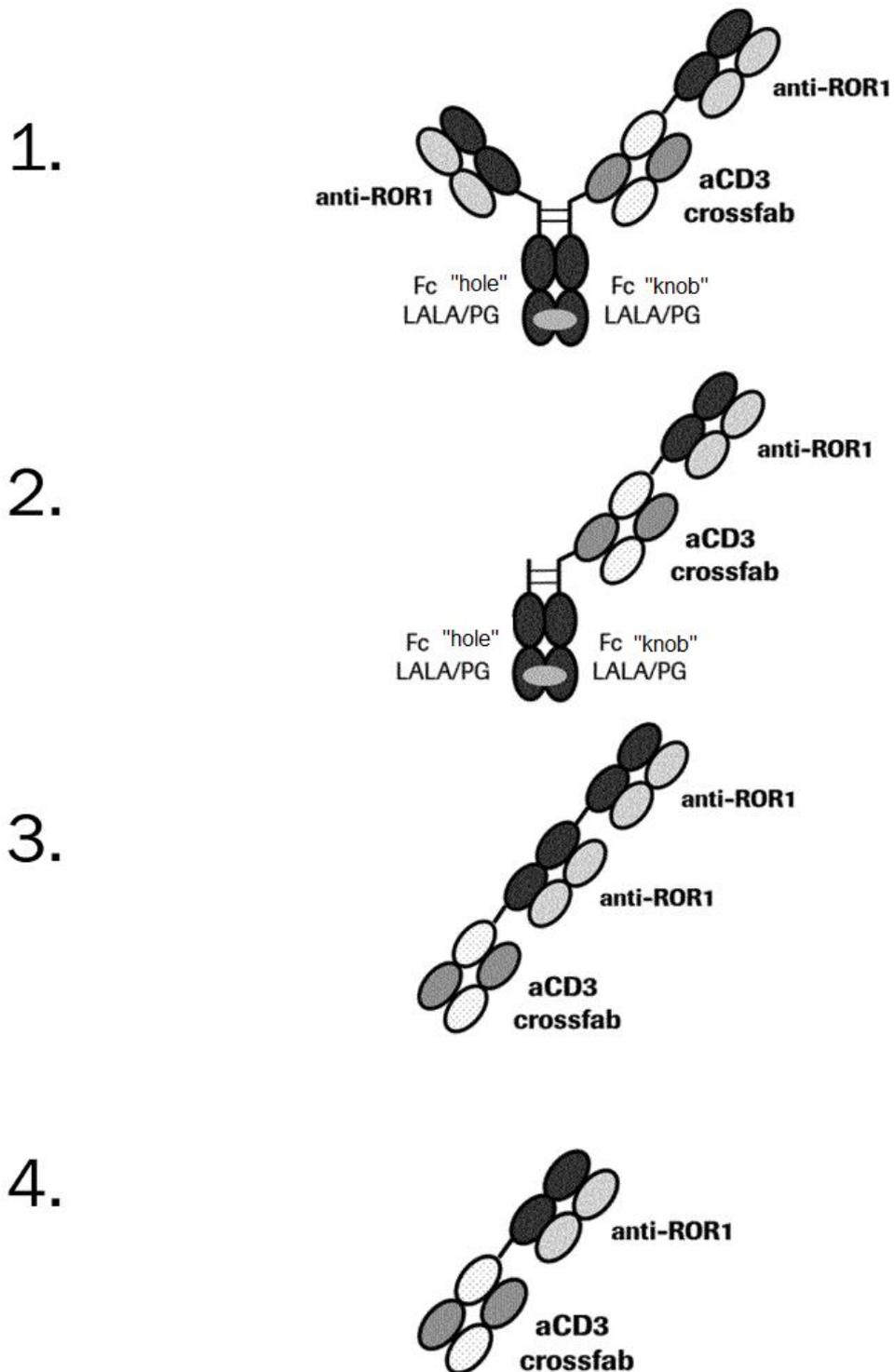
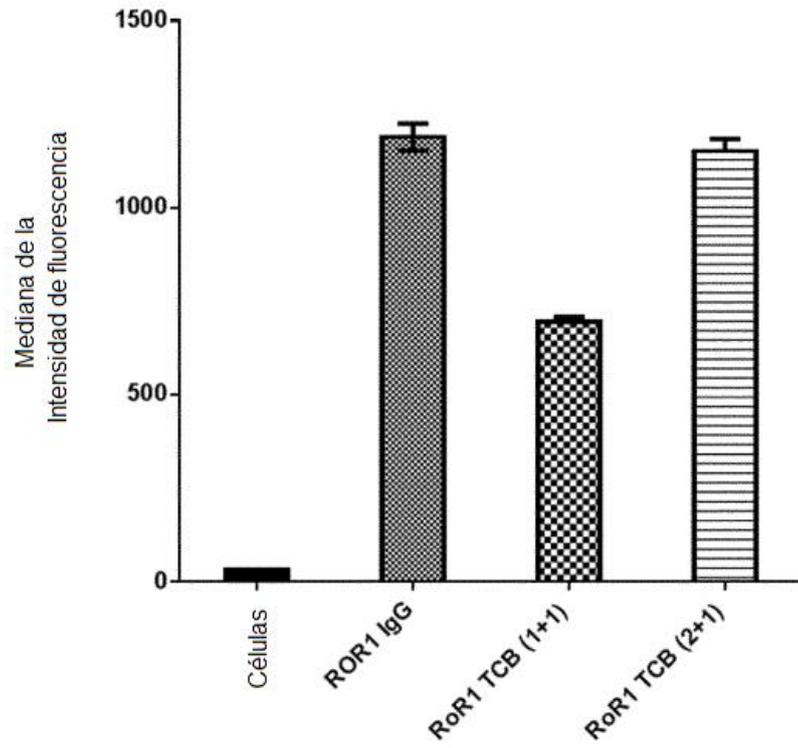


Fig. 2.

A.



B.

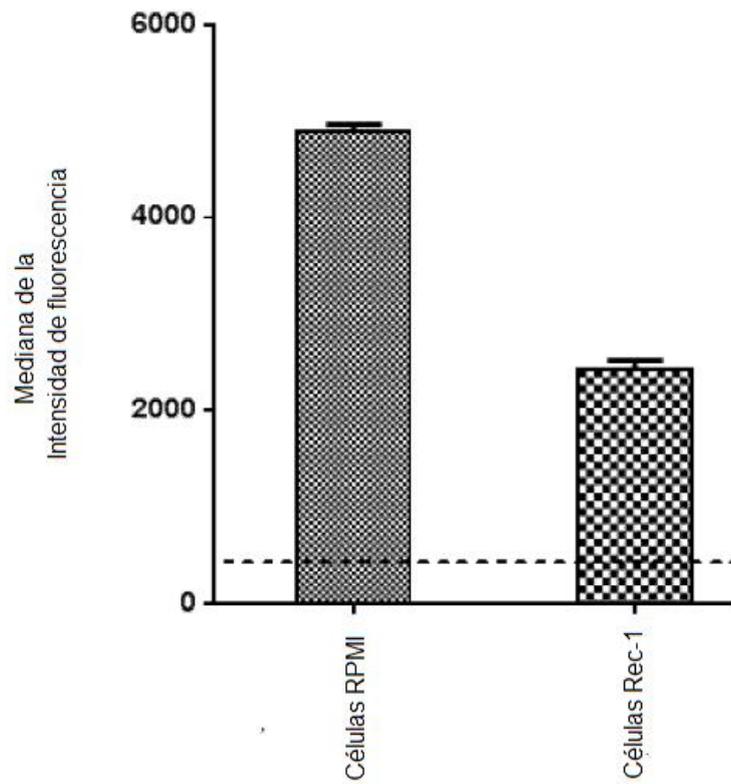


Fig. 3.

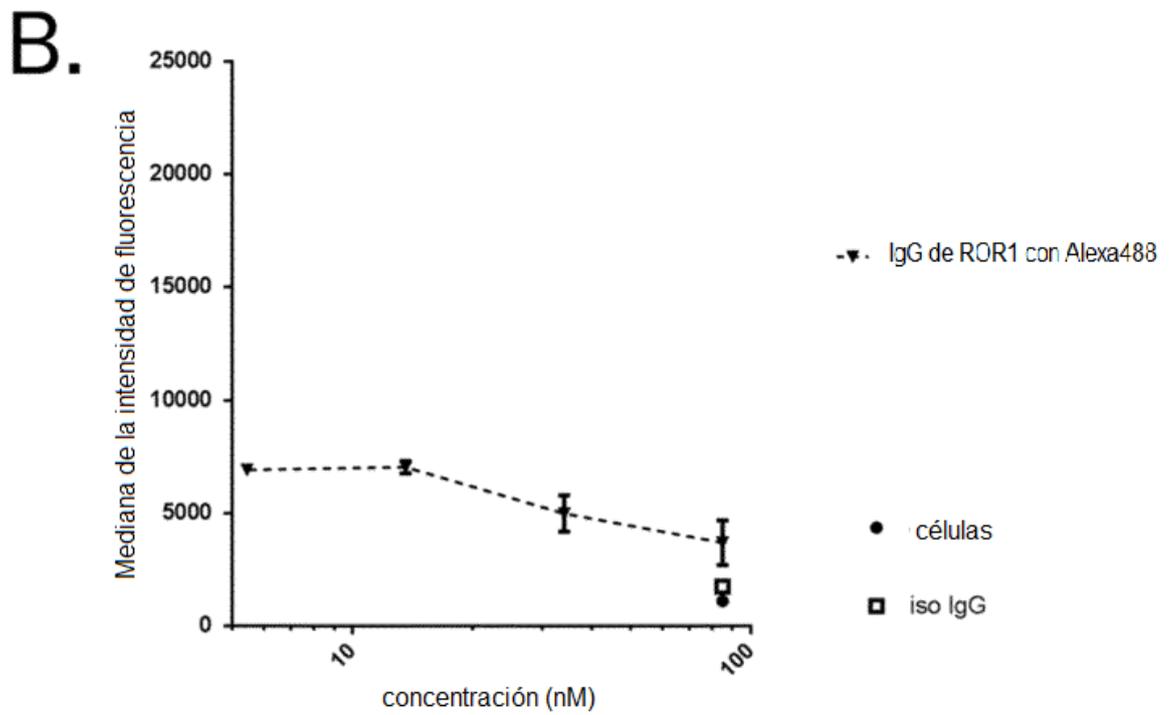
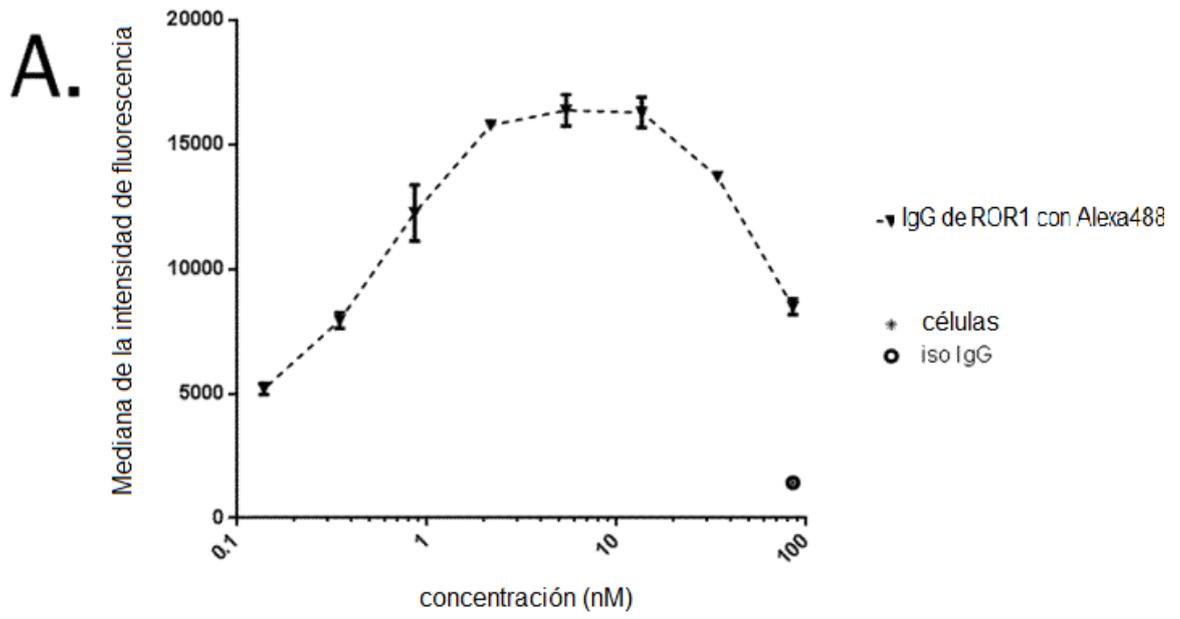
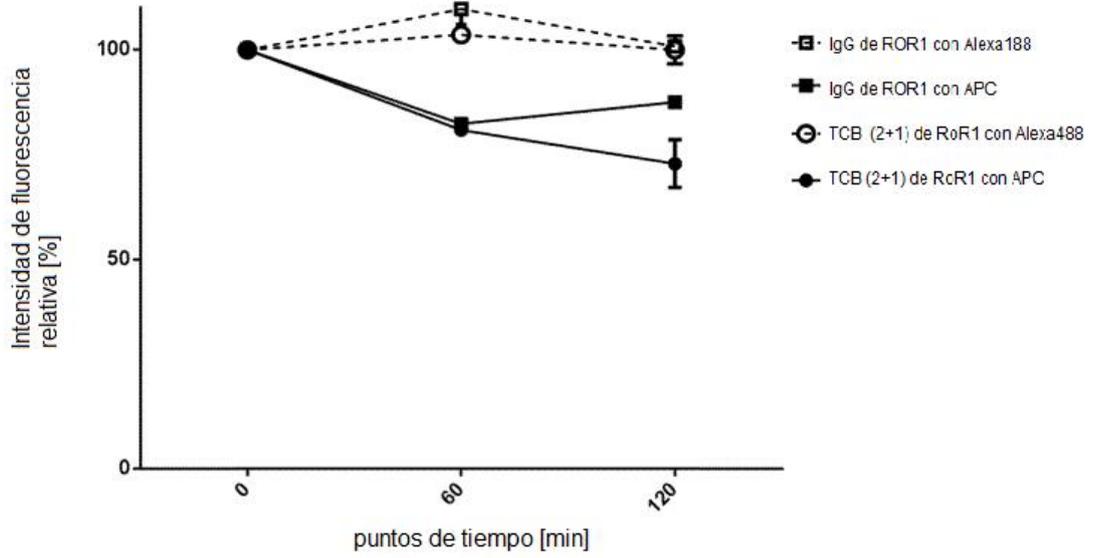
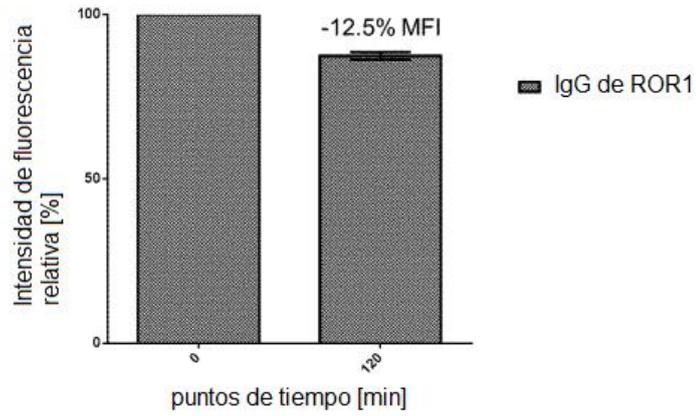


Fig. 4.

A.



B.



C.

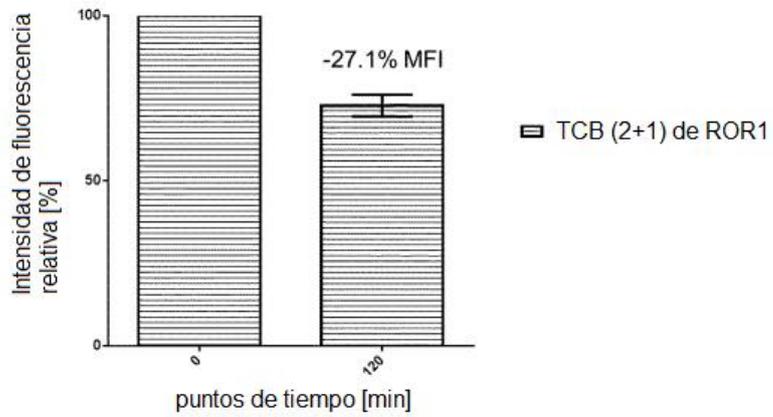


Fig. 5.

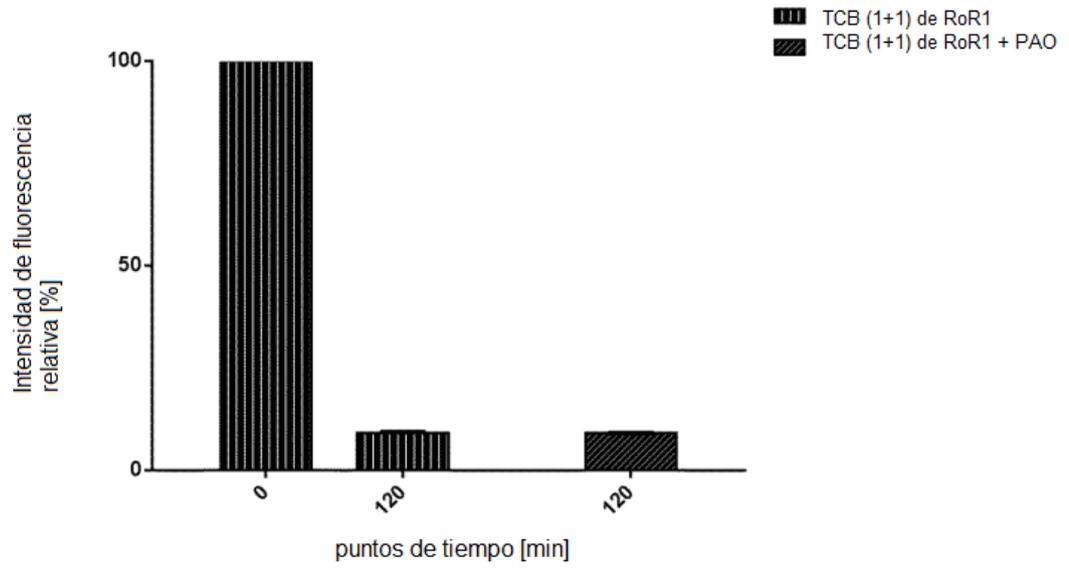
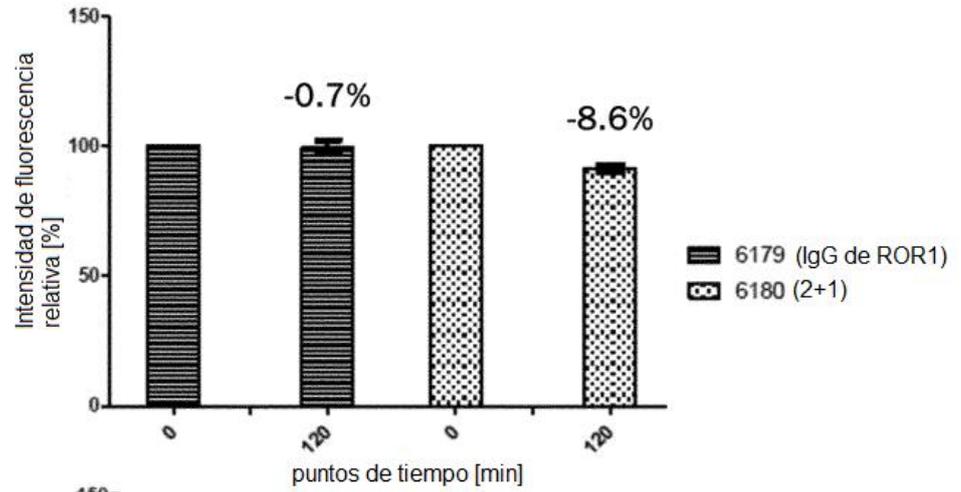


Fig. 6.

A.



B.

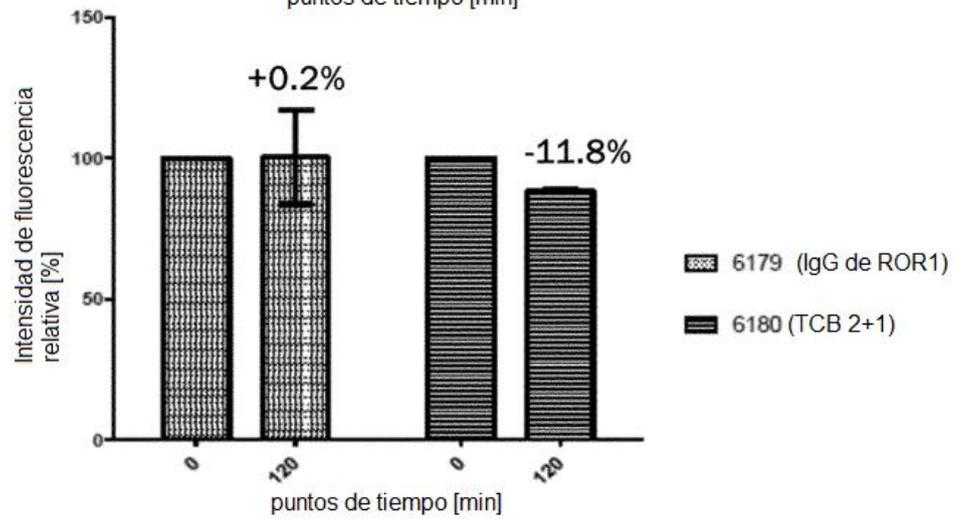


Fig. 7

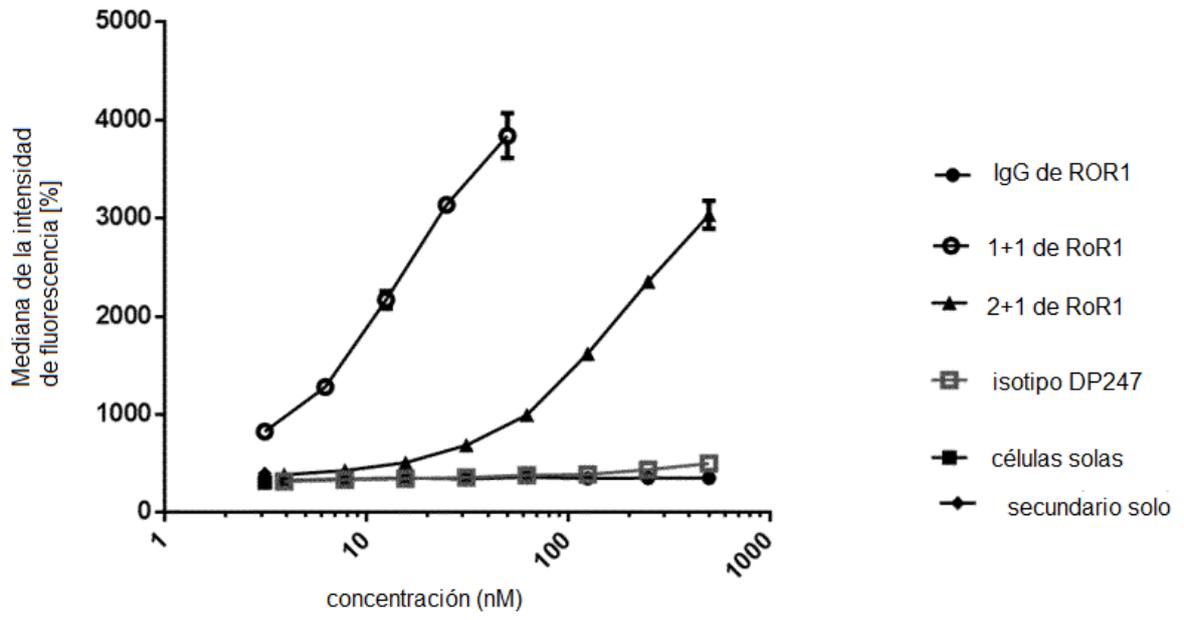


Fig. 8.

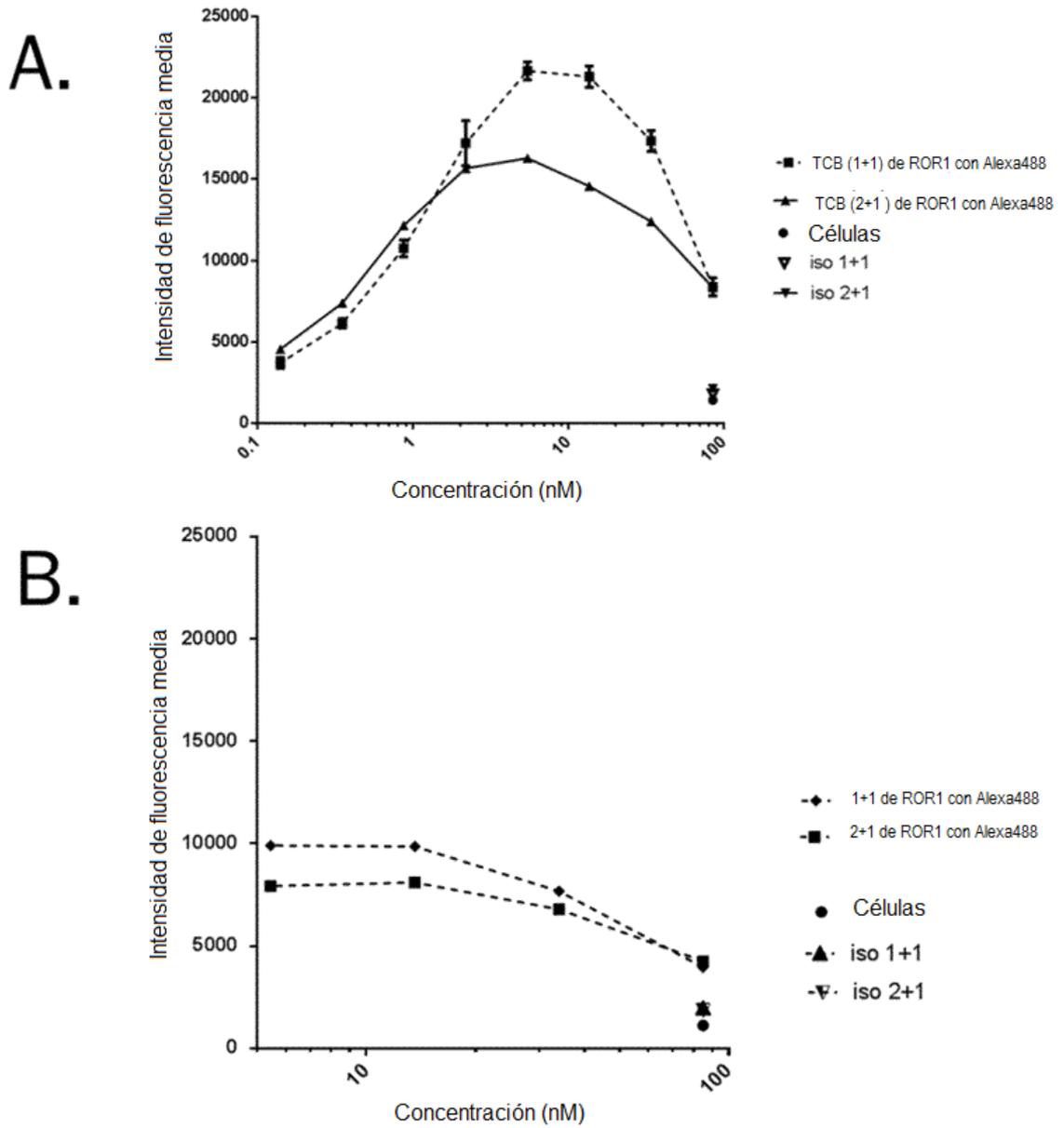
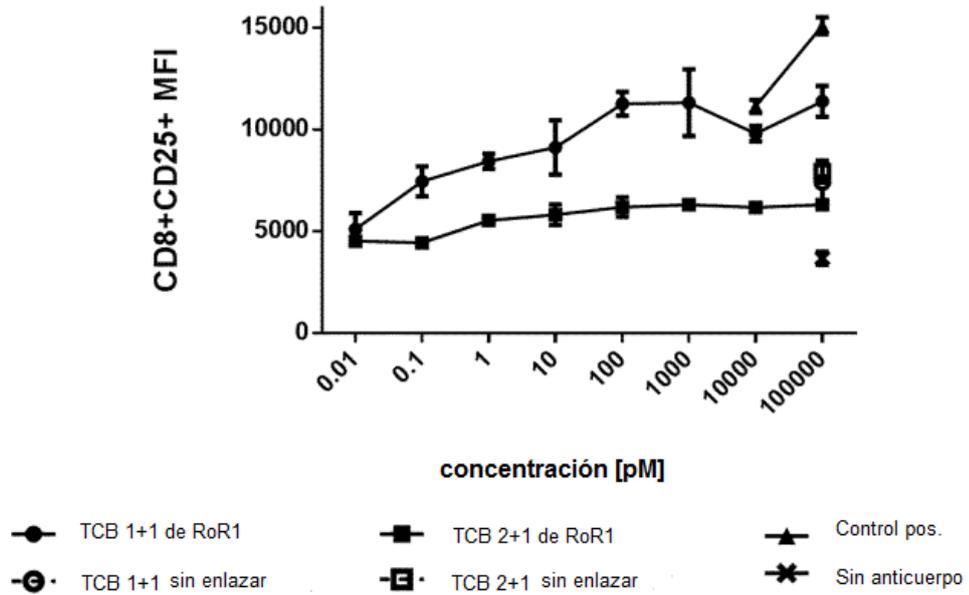


Fig. 9.

A.



B.

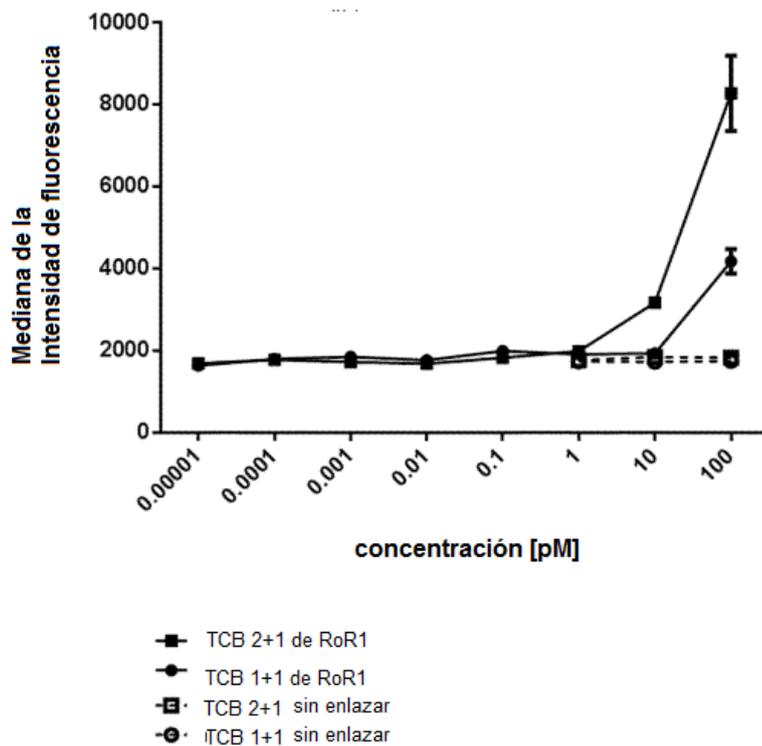
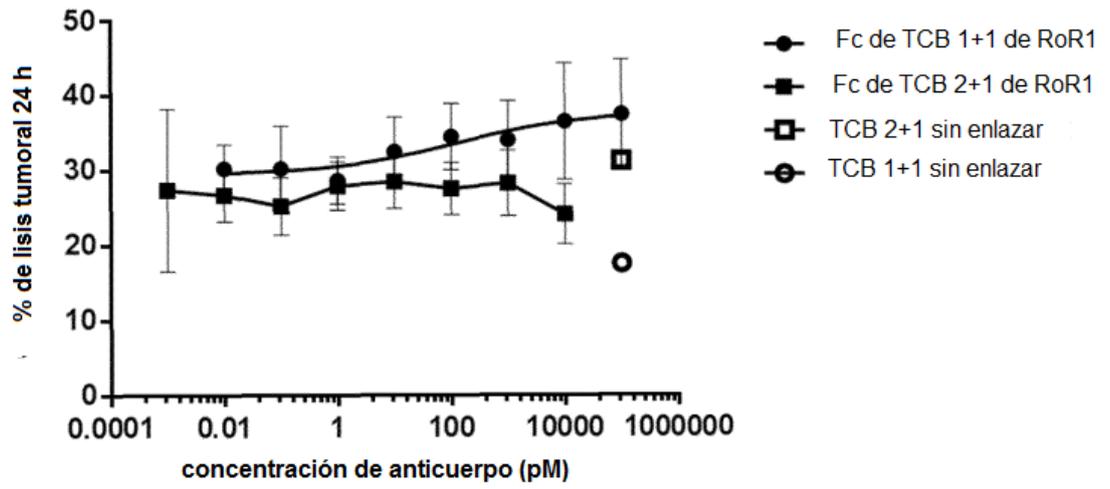


Fig. 10.

A.



B.

