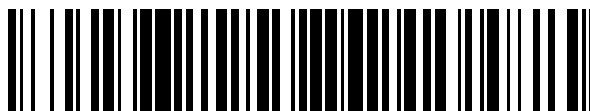


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 533**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012 E 17167174 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3252076**

54 Título: **Uso diagnóstico de anticuerpos contra la proteína ROR1**

30 Prioridad:

14.01.2011 US 201161433043 P

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

05.05.2020

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**KIPPS, THOMAS, J.;
WIDHOPF II, GEORGE, F. y
CUI, BING**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 758 533 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

Uso diagnóstico de anticuerpos contra la proteína ROR1

Antecedentes

Las tirosina-quinazas son mediadores importantes de la cascada de señalización, determinando papeles clave en diversos procesos biológicos como crecimiento, diferenciación, metabolismo y apoptosis en respuesta a estímulos externos e internos. Diversos estudios han implicado el papel de las tirosina-quinazas en la fisiopatología del cáncer. Schlessinger J. (2000) Cell, 103:211-225; y Robinson *et al.* (2000) Oncogene, 19: 5548-5557. MacKeigan y colaboradores usaron un enfoque de interferencia por ARN (iARN) a gran escala para identificar quinazas que podrían regular la supervivencia y apoptosis de una línea celular tumoral humana (HeLa), la iARN de ROR1 se encontró como una de las más potentes en la inducción de apoptosis entre el conjunto de iARN dirigidas a cada uno de 73 genes diferentes codificadores de quinazas. MacKeigan *et al.* (2005) Nat Cell Biol., 7: 591-600. Sin embargo, estos investigadores no examinaron la expresión ni la función de la proteína ROR1 en estas células.

La ROR1, un receptor huérfano similar al receptor de tirosina-quinasa, es una molécula expresada a altos niveles durante la embriogénesis que desempeña un papel principal en el desarrollo de esqueleto, pulmones y sistema nervioso. La expresión de ROR1 disminuye en gran medida en células de mamífero postparto hasta niveles que son apenas detectables. La ROR1 es un receptor de membrana con un dominio similar a quinasa intracelular y un dominio rico en cisteína similar a Frizzled extracelular que es común en receptores de miembros de la familia Wnt. La ROR1 es un miembro de la familia ROR que está evolutivamente conservado entre *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, ratones y seres humanos. Wilson C, Goberdhan DC, Steller H. Dror, *A potential neurotrophic receptor gene, encodes a Drosophila homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases*. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:7109-7113; Oishi *et al.* (1997) J Biol Chem., 272:11916-11923; Masiakowski *et al.* (1992) J Biol Chem., 267:26181-26190; Forrester *et al.* (2002) Cell Mol Life Sci., 59:83-96; y Oishi *et al.* (1999) Genes Cells, 4:41-56. El papel funcional real de la proteína ROR1 durante la embriogénesis es desconocido, aunque se cree que es un receptor para proteínas Wnt que regulan la polaridad celular y las interacciones de célula con célula.

Aunque es principalmente una proteína embrionaria, la ROR1 se expresa excepcionalmente en ciertas células cancerosas, incluyendo en la leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico pequeño, linfoma de linfocitos B de células marginales, linfoma de Burkett y otros cánceres (por ejemplo, cánceres de mama), pero no en tejidos y células de adultos normales. En un estudio reciente, se encontró que la ROR1, tanto a nivel de ARN mensajero (ARNm) como de proteína, se expresaba en gran medida en linfocitos B de LLC, pero no en linfocitos B normales. Además, se encontró que la ROR1 es un receptor de Wnt5a, que podría inducir la activación de NF-κB cuando se coexpresa con ROR1 en células HEK293 y mejora la supervivencia de células de LLC *in vitro*. Esto indica que la ROR1 es un receptor de señalización de la supervivencia a la LLC para Wnt5a. Otro estudio encontró que la ROR1 se expresaba también en leucemia linfocítica aguda (LLA). Shabani *et al.* (2007) Tumour Biol., 28:318-326; and Baskar *et al.* (2008) Clin Cancer Res., 14:396-404. La expresión de la proteína ROR1 se ha demostrado ahora en una variedad de cánceres hematológicos y de tumores sólidos.

El control terapéutico de la expresión de ROR1 es necesario. Sin embargo, aunque están comercialmente disponibles anticuerpos policlonales anti-ROR1 producidos contra el péptido ROR1, los inventores desarrollaron un anticuerpo monoclonal anti-ROR1, denominado 4A5, que reacciona con la proteína ROR1 natural y es capaz de detectar la expresión en la superficie celular de ROR1 para análisis citométrico de flujo. Fukuda, *et al.*, (2008) PNAS 105(9):3047-3052 describen un método para diagnosticar la LLC por la detección de la ROR-1 expresada en células leucémicas usando el mAb 4A5. Sin embargo, no han estado disponibles anticuerpos terapéuticos robustos con capacidad demostrable para inhibir la proliferación de células cancerosas mediada por ROR-1 en un grado que sea terapéuticamente significativo para retardar o prevenir el crecimiento y la metástasis.

Sumario de la invención:

Esta invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar cáncer que comprende poner en contacto supuestas células cancerosas obtenidas de un sujeto humano con un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína ROR1 y está constituido por una región de cadena pesada que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% con la SEQ ID NO: 14 y una región de cadena ligera correspondiente que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la SEQ ID NO: 16, y detectar la unión con ROR-1 expresada en dichas células, en donde el anticuerpo requiere para la unión un residuo de ácido glutámico correspondiente al encontrado en la posición 138 del dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana.

La descripción proporciona anticuerpos y combinación de anticuerpos para la inhibición *in vivo* e *in vitro* de la proliferación mediada por células ROR-1 de células de sujetos con cáncer, incluyendo linfomas, LLC, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de linfocitos B de células marginales, linfoma de Burkett, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma epinocelular epitelial, melanoma, mieloma, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario,

cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello, pero no en linfocitos sanguíneos o esplénicos de pacientes no leucémicos o adultos normales.

Los anticuerpos de la descripción son también útiles para la diferenciación entre células cancerosas que expresan ROR1 ("cáncer de ROR1") y células normales. Por ejemplo, se proporciona un inmunoensayo que detecta ROR1 en una muestra de un sujeto mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo específico de ROR1 de la descripción y la detección de la inmunorreactividad entre el anticuerpo y ROR1 en la muestra.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se diagnostica un cáncer de ROR1 en un sujeto detectando la presencia o cantidad de proteína ROR1 en una muestra.

La presente descripción incluye composiciones que incluyen anticuerpos monoclonales aislados, purificados y sus combinaciones que se unen específicamente a la proteína receptora ROR1.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una serie de gráficos que ilustran los resultados del análisis citométrico de flujo de la expansión de linfocitos B de leucemia CD5+B220^{low} en ratones ROR1 Tg después de la transferencia adoptiva de 1×10^7 esplenocitos de un ratón ROR1 x TCL1 Tg. El panel superior representa la expansión de 2 a 4 semanas después de la transferencia adoptiva. Se indica el porcentaje de células leucémicas en el gráfico de contornos de mCD5 (eje x) frente a mB220 (eje y) por encima de la ventana en linfocitos CD5+B220^{low}. El panel inferior representa la expresión relativa de ROR1 (eje x) usando el mAb anti-ROR1 4A5 de ratón.

La Figura 2 es un diagrama que resume el análisis del mAb anti-ROR1 en la transferencia adoptiva y el injerto de esplenocitos leucémicos ROR1 XTCL1. Se administraron a ratones ROR1 Tg (4 ratones/grupo) 250 µg de 4A5, D10 o mIgG de control por vía i.v. el día 0. Al día siguiente, se transfirieron adoptivamente por vía i.v. 1×10^7 esplenocitos de un ratón ROR1 x TCL1 Tg. En todos los ratones se monitorizó posteriormente cada semana la expansión de linfocitos B leucémicos CD5+B220^{low} por citometría de flujo empezando 2 semanas después de la transferencia.

La Figura 3 es una serie de gráficos que ilustran los resultados de un análisis citométrico de flujo que demuestra que los anticuerpos anti-ROR1 de la invención inhibían el desarrollo de leucemia similar a la LLC en ratones ROR1 Tg. 2 semanas después de la transferencia adoptiva, se efectuaron los análisis FACS de PBMC. Los datos mostraron que el anticuerpo D10 anti-ROR1, pero no el anticuerpo 4A5 anti-ROR1, podían inhibir notablemente la expansión de linfocitos B leucémicos CD5^{dull}B220⁺ y ROR1^{bright}B220⁺.

La Figura 4A es una serie de gráficos que ilustran los resultados de ensayos *in vivo* en un modelo de murido de cáncer de mama humano. Los anticuerpos anti-ROR1 inhibían la metástasis de cáncer de mama en ratones con deficiencia de rag-/- g-/- . Se transfirieron células de cáncer de mama 5E5 MDA-MB-231 por inyección i.v. a ratones rag-/- g-/- el día 1. Se inyectaron también en ratones con deficiencia de rag-/- g-/- por vía i.v. control isotópico o anticuerpo anti-ROR1 (4A5, D10 y 4A5 más D10) los días 1, 3, 7 y 14 a 100 mg por ratón. La Figura 4A (centro) proporciona también imágenes de procedimientos de obtención de imágenes por IVIS *in vivo* de los ratones anteriores, que se efectuaron cada semana. 5 semanas después, se sacrificaron los ratones y se efectuaron análisis de histología (Figura 4B). El anticuerpo D10 anti-ROR1 y la combinación de anticuerpos (4A5 más D10) inhibían ambos significativamente la metástasis de cáncer de mama, siendo la inhibición por D10 solo mayor que la inhibición por 4a5 solo.

La Figura 5 proporciona una comparación de secuencias codificadoras de nucleótidos de la cadena pesada de Ig 4A5 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana.

La Figura 6 proporciona una comparación de secuencias codificadoras de nucleótidos de la cadena pesada de Ig G6 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana.

La Figura 7 proporciona una comparación de secuencias codificadoras de nucleótidos de la cadena pesada de Ig G3 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana.

La Figura 8 proporciona una comparación de secuencias codificadoras de nucleótidos de la cadena pesada de Ig H10 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana.

La Figura 9 proporciona una comparación de secuencias codificadoras de nucleótidos de la cadena pesada de Ig D10 (VH) con la VH de inmunoglobulina (Ig) de ratón y humana de línea germinal más cercana.

La Figura 10 es un diagrama y esquema que representa la naturaleza altamente conservada de ROR1 humana y de murido.

La Figura 11 es una comparación de nucleótidos que representa la estructura de dominio y la homología de secuencias de la proteína extracelular ROR1 humana y de murido.

La Figura 12 es una tabla que indica el dominio extracelular con que los mAb anti-ROR1 se unen a la proteína ROR1.

La Figura 13 es un diagrama que representa las proteínas ROR1 quiméricas generadas para determinar el dominio de unión de cada uno de los mAb anti-ROR1.

La Figura 14 es un diagrama que representa las proteínas ROR1 truncadas generadas para determinar las subregiones con que se une cada uno de los mAb anti-ROR1.

- 5 La Figura 15 es un diagrama que representa los aminoácidos que se muridizaron para determinar los residuos críticos para la unión del mAb a ROR1 humana y una transferencia de Western que muestra que el residuo de ácido glutámico 138 es crítico para la unión del anticuerpo D10 a ROR1 humana.

La Figura 16 es una gráfica que indica los valores de K_D para el anticuerpo D10 (Figura 16a) y 4A5 (Figura 16b).

- 10 La Figura 17 es una serie de gráficas que ilustran que el anticuerpo D10 anti-ROR1 es altamente activo en ensayos *in vivo*.

- 15 La Figura 18 es un diagrama que resume el análisis del mAb anti-ROR1 en la transferencia adoptiva y el injerto de esplenocitos leucémicos ROR1 X TCL1. Se administraron a ratones ROR1 Tg (5 ratones/grupo) 250 μ g de 4A5, D10 o mlgG de control por vía i.v. el día 0. Al día siguiente, se transfirieron adoptivamente por vía i.v. 5×10^5 esplenocitos de un ratón ROR1 x TCL1 Tg. En todos los ratones se monitorizó posteriormente cada semana la expansión de linfocitos B leucémicos CD5^{dull}B220⁺ por citometría de flujo empezando 2 semanas después de la transferencia.

- 20 La Figura 19 es una serie de gráficos que ilustran los resultados de un análisis citométrico de flujo de los anticuerpos anti-ROR1 que inhiben el desarrollo de leucemia similar a la LLC en ratones ROR1 Tg. 2 semanas después de la transferencia adoptiva, se efectuaron los análisis FACS de PBMC. Los datos mostraban que el anticuerpo D10 anti-ROR1, pero no el anticuerpo 4A5 anti-ROR1, podía inhibir notablemente la expansión de linfocitos B leucémicos CD5^{dull}B220⁺ y ROR1brightB220⁺.

La Figura 20 es un gráfico que ilustra que el anticuerpo D10 anti-ROR1 inhibe el desarrollo y expansión de linfocitos B leucémicos ROR1 x TCL1 en la sangre de animales receptores hasta 2 semanas después de recibir la última infusión del mAb.

La Figura 21 es una representación de la rápida internalización del anticuerpo D10 anti-ROR1 en células de LLC.

- 25 La Figura 22 es una serie de gráficos que ilustran los resultados del análisis citométrico de flujo que muestran que los anticuerpos D10 y 4A5 anti-ROR1 están internalizados ambos en células de LLC. Se incubaron células de LLC con Ab-Alex647 anti-hROR1 durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron las células y se dejaron a 4°C o se incubaron durante 4 horas a 37°C, seguido de citometría de flujo. Se muestra también la señal de fondo sin tinción.

- 30 La Figura 23 es un gráfico que ilustra la cinética de la internalización de los anticuerpos D10 y 4A5 anti-ROR1.

La Figura 24 es un diagrama que representa los aminoácidos que se muridizaron para determinar los residuos críticos para la unión del mAb a la ROR1 humana y una transferencia de Western que muestra que el residuo de isoleucina 111 es crítico para la unión del anticuerpo 4A5 a ROR1 humana.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 35 La materia en cuestión divulgada actualmente se describe más completamente a continuación.

- Los anticuerpos de la invención se produjeron monoclonalmente usando técnicas como se describen anteriormente. Brevemente, los anticuerpos de origen natural son generalmente tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Experimentalmente, los anticuerpos pueden escindirse con la enzima proteolítica papaína, que causa la rotura de cada una de las cadenas pesadas, produciendo tres subunidades separadas. Las dos unidades que consisten en una cadena ligera y un fragmento de la cadena pesada aproximadamente igual a la masa de la cadena ligera se denominan fragmentos Fab (es decir, los fragmentos de unión al antígeno). La tercera unidad, consistente en dos segmentos iguales de la cadena pesada, se denomina el fragmento Fc. El fragmento Fc típicamente no está implicado en la unión antígeno-anticuerpo, pero es importante en procesos posteriores implicados en retirar el cuerpo del antígeno.

- 45 Debido a que los fragmentos Fab y F(ab')₂ son menores que las moléculas de anticuerpo intactas, están disponibles más dominios de unión al antígeno que cuando se usan moléculas de anticuerpo enteras. Se sabe que la escisión proteolítica de una molécula de IgG típica con papaína produce dos fragmentos separados de unión a antígeno denominados fragmentos Fab que contienen una cadena ligera intacta unida a una porción aminoterminal de la cadena pesada contigua a por medio de un enlace disulfuro. La porción restante de la molécula de inmunoglobulina digerida con papaína es conocida como el fragmento Fc, y consiste en las porciones carboxiterminales del anticuerpo dejadas intactas y unidas conjuntamente a través de enlaces disulfuro. Si se digiere un anticuerpo con pepsina, se produce un fragmento conocido como F(ab')₂, que carece de la región Fc, pero contiene ambos dominios de unión al antígeno mantenidos juntos por enlaces disulfuro entre las cadenas ligera y pesada contiguas (como los fragmentos Fab) y también enlaces disulfuro entre las porciones restantes de las cadenas pesadas

contiguas (Handbook of Experimental Immunology. Vol 1: Immunochemistry, Weir, D. M., Editor, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986)).

Como se reconoce fácilmente por los especialistas en la técnica, pueden producirse también mediante métodos bien conocidos en la técnica anticuerpos alterados (por ejemplo, quiméricos, humanizados, injertados con CDR, bifuncionales), dímeros polipeptídicos de anticuerpos (es decir, una asociación de dos componentes de cadena polipeptídica de un anticuerpo, por ejemplo, un brazo de un anticuerpo que incluye una cadena pesada y una cadena ligera, o un fragmento Fab que incluye los dominios de anticuerpo VL, VH, CL y CH, o un fragmento Fv que comprende un dominio VL y un dominio VH), anticuerpos monocatenarios (por ejemplo., un fragmento scFv (es decir, Fv monocatenario) que incluye un dominio VL unido a un dominio VH por un enlazador, y similares).

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

Se inyectan clones seleccionados por HAT en ratones para producir grandes cantidades de mAb en ascitis como se describe por Galfre, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.*, 73:3-46 (1981), que pueden purificarse usando cromatografía en columna de proteína A (BioRad, Hercules, Calif.). Los mAb se seleccionan basándose en (a) su especificidad para ROR1, (b) una alta afinidad de unión, (c) el isotipo y (d) la estabilidad.

Los mAb pueden cribarse o ensayarse para determinar la especificidad para ROR1 usando cualquiera de una variedad de técnicas estándares, incluyendo transferencia de Western (Koren, E. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 876:91-100 (1986)) y ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) (Koren, E. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 876:91-100 (1986)).

Pueden generarse formas humanizadas de anticuerpos de ratón uniendo las regiones CDR de anticuerpos no humanos con regiones constantes humanas mediante técnicas de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989 y WO 90/07861). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse usando métodos de presentación en fago (véanse, por ejemplo, Dower *et al.*, WO 91/17271; McCafferty *et al.*, WO 92/01047). En estos métodos, se producen colecciones de fagos en las que los miembros presentan diferentes anticuerpos sobre sus superficies externas. Los anticuerpos se presentan habitualmente como fragmentos Fv o Fab. Puede seleccionarse el fago que presenta anticuerpos con una especificidad deseada mediante enriquecimiento por afinidad.

Pueden seleccionarse anticuerpos humanos por experimentos de unión competitiva, o de otro modo, para tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular. Usando estas técnicas, un anticuerpo para ROR1 humanizado que tiene el dominio de región constante de IgG1 humana y el dominio de región constante de cadena ligera kappa humana con las regiones variables de cadena pesada y ligera de ratón. El anticuerpo humanizado tiene la especificidad de unión de un mAb para ROR1 de ratón, específicamente el mAb 4A5 descrito en los Ejemplos 4 y 5.

Puede ser deseable producir y usar fragmentos funcionales de un mAb para una aplicación particular. La estructura básica bien conocida de una molécula de IgG típica es una molécula en forma de Y tetramérica simétrica de aproximadamente 150.000 a 200.000 dáltones consistente en dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (que contienen aproximadamente 220 aminoácidos) y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (que contienen aproximadamente 440 aminoácidos). Las cadenas pesadas están unidas entre sí a través de al menos un enlace disulfuro. Cada cadena ligera está unida con una cadena pesada contigua por un enlace disulfuro. Está localizado un sitio o dominio de unión al antígeno en cada brazo de la molécula de anticuerpo en forma de Y, y está formado entre las regiones aminoterminales de cada par de cadenas ligera y pesada unidas por disulfuro. Estas regiones aminoterminales de las cadenas ligera y pesada consisten en aproximadamente sus primeros 110 aminoácidos aminoterminales y son conocidas como las regiones variables de las cadenas ligera y pesada. Además, dentro de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, hay regiones hipervariables que contienen tramos de secuencias de aminoácidos conocidas como regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR son responsables de la especificidad del anticuerpo para un sitio particular en una molécula de antígeno denominada epítipo. Por tanto, la molécula de IgG típica es divalente al poder unirse a dos moléculas de antígeno, debido a que cada sitio de unión al antígeno es capaz de unirse al epítipo específico de cada molécula de antígeno. Las regiones carboxiterminales de las cadenas ligera y pesada son similares o idénticas a las de otras moléculas de anticuerpo y se denominan regiones constantes. La secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas de un anticuerpo particular define que clase de anticuerpo es, por ejemplo IgG, IgD, IgE, IgA o IgM. Algunas clases de anticuerpos contienen dos o más anticuerpos idénticos asociados entre sí en disposiciones de unión a antígeno multivalentes.

Pueden usarse fragmentos Fab y F(ab')₂ de mAb que se unen a ROR1 en lugar de mAb enteros. Debido a que los fragmentos Fab y F(ab')₂ son menores que las moléculas de anticuerpo intactas, están disponibles más dominios de

unión a antígeno que cuando se usan moléculas de anticuerpo enteras. Se sabe que la escisión proteolítica de una molécula de IgG típica con papaína produce dos fragmentos separados de unión a antígeno denominados fragmentos Fab que contienen una cadena ligera intacta unida a una porción aminoterminal de la cadena pesada contigua a través de un enlace disulfuro. La porción restante de la molécula de inmunoglobulina digerida con papaína es conocida como el fragmento Fc, y consiste en las porciones carboxiterminales del anticuerpo dejadas intactas y unidas conjuntamente a través de enlaces disulfuro. Si se digiere un anticuerpo con pepsina, se produce un fragmento conocido como $F(ab')_2$, que carece de la región Fc, pero contiene ambos dominios de unión a antígeno mantenidos juntos por enlaces disulfuro entre las cadenas ligera y pesada contiguas (como los fragmentos Fab) y también enlaces disulfuro entre las porciones restantes de las cadenas pesadas contiguas (Handbook of Experimental Immunology). Vol 1: Immunochemistry, Weir, D. M., Editor, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986)).

Con respecto a anticuerpos particulares, "unión específica" hace referencia a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-8} M o menor, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad (expresada por K_D) que es al menos 10 veces menor, y preferiblemente al menos 100 veces menor, que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o de un antígeno estrechamente relacionado. Como alternativa, el anticuerpo puede unirse con una afinidad correspondiente a una K_A de aproximadamente 10^6 M^{-1} o de aproximadamente 10^7 M^{-1} , o de aproximadamente 10^8 M^{-1} , o de 10^9 M^{-1} o mayor, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad (expresada por K_A) que es al menos 10 veces mayor, y preferiblemente al menos 100 veces mayor, que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o de un antígeno estrechamente relacionado.

También, la referencia a "un anticuerpo que tiene especificidad de unión para la proteína ROR-1" incluye fragmentos de anticuerpo que tienen una identidad de secuencia al menos 90 o 95% con cualquiera de las secuencias polipeptídicas descritas en las SEQ ID NO: 14 y 16, incluyendo variantes modificadas por mutación para mejorar la su utilidad (por ejemplo, capacidad mejorada para dirigirse a tipos de células específicas y similares). Tales variantes incluyen aquellas en donde están introducidas una o más sustituciones conservadoras en la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo.

Tales variantes incluyen aquellas donde están introducidas una o más sustituciones en la secuencia nucleotídica de la cadena pesada y/o la secuencia nucleotídica de la cadena ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones, la variante tiene una cadena ligera y/o una cadena pesada que tiene una secuencia nucleotídica al menos 90% o al menos un 95% idéntica a cualquier de las secuencias nucleotídicas expuestas en las SEQ ID NO: 13 y 15.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican rasgos estructurales de los anticuerpos de la invención incluyen aquellas cuyas secuencias se exponen a continuación. Cada secuencia polinucleotídica va seguida por la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. Las secuencias de la cadena ligera que se considera que son "correspondientes" a secuencias de la cadena pesada son las enumeradas por ser del mismo anticuerpo; es decir, las secuencias de la cadena pesada de F2 corresponden a las secuencias de la cadena ligera de F2, las secuencias de la cadena pesada de D10 corresponden a las secuencias de la cadena ligera de D10 y así sucesivamente.

SEQ ID NO: 1: Secuencia codificadora de la región variable de la cadena pesada del mAb 4A5 anti-ROR1 de ratón

```
GAAGTGAAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATT
CACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGACAGATTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGG
TCGCATCCATTAGTCGTG
GTGGTACCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGATAATGTC
AGGAACATCCTGTACCTG
CAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGGAAGATATGATTACGA
CGGGTACTATGCAATGGA
```

CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 2: Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena pesada del mAb 4A5 anti-ROR1 de ratón:

EVKLIVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQIPEKRLEWVASISRGGTTYYPDS
VKGRFTISRDNVRNILYL

QMSSLRSEDAMYYCGRYDYDGYAMDYWGQTSVTVSS

SEQ ID NO: 3: Secuencia codificadora de la región variable de la cadena ligera del mAb 4A5 anti-ROR1 de ratón:

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCC

GGACATTAATAGCTATTTAAGCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGA
TCTATCGTGCAAACAGAT

TGGTTGATGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCGGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACC
ATCAACAGCCTGGAGTAT

GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAATTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG
GACCAAGCTGGAAATGAA

AC

SEQ ID NO: 4: Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena ligera del mAb 4A5 anti-ROR1 de ratón:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
SGGGSGQDYSLTINSLEY

5 EDMGIYYCLQYDEFPPYTFGGGKLEMK

SEQ ID NO: 5: Secuencia codificadora de la región variable de la cadena pesada de los mAb F2, F12 y G6 anti-ROR1 de ratón:

GAGGTCCAGCTACAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATC
CTGCAAGGCTTCTGGTTT

CGCATTCCTGGCTACAACATGAACTGGGTGAAACAGACCAATGGAAAGAGCCTTGAGTGGA
TTGGAAGTATTGATCCTT

ACTATGGTGGTTCTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAA
TCCTCCAGCACAGCCTAC

ATGCAACTCAAGAGCCTCACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATCCCCGGG
GGGGGACTATGCTATGGA

CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 6: Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena pesada de los mAb F2, F12 y G6 anti-ROR1 de ratón:

10

EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFAFTGYNMNVKQTNKGSLEWIGSIDPYYGGSTYNQ
KFKDKATLTVDKSSSTAY

MQLKSLTSDDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 7: Secuencia codificadora de la región variable de la cadena ligera de los mAb F2, F12 y G6 anti-ROR1 de ratón:

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTGTAGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGTAAGGCGAGTCA

GGGCATTAATAGCTATTTCAGGCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGA
TTTATCGTGGAATAGAT

TGGTGGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACC
ATCAGCAGCCTGGAGTAT

GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG
GACCAAGCTGGAAATAAA

AC

5 SEQ ID NO: 8: Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena ligera de los mAb F2, F12 y G6 anti-ROR1 de ratón:

DIKMTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINSYSGWFQQKPGKSPKTLIYRGNRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYSLTISSLEY

EDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 9 Secuencia codificadora de la región variable de cadenas pesadas del mAb G3 anti-ROR1 de ratón:

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTA

CAACTTCACCAACTACTGGATAAACTGGGTGAAGCTGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGA
TTGGAGAAATTTATCCTG

GTAGTGGTAGTACTAATTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACA
TCCTCCAGCACAGCCTAC

ATGCAACTCAGCAGCCTGGCATCTGAAGACTCTGCTCTCTATTACTGTGCAAGAGATGGTAA
CTACTATGCTATGGACTA

CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

10 SEQ ID NO: 10 Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena pesada del mAb G3 anti-ROR1 de ratón:

QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTNYWINWVKLRPGQGLEWIGEIYPGSGSTNYNE
KFKSKATLTADTSSSTAY

MQLSSLASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQGSVTVSS

SEQ ID NO: 11 Secuencia codificadora de la región variable de la cadena ligera del mAb G3 anti-ROR1 de ratón:

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCAGGGCAAGTCA

GGACATTAACAATTATTTAAACTGGTATCAACAGAAACCAGATGGAACGTGTTAAACTCCTGA
TCTACTACACATCAGCAT

TACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCTGAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACC
ATTAGCAACCTGGAACAA

GAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCTCCGTACACGTTCTGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAAAT

AAAAC

5 SEQ ID NO: 12 Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena ligera del mAb G3 anti-ROR1 de ratón:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSALHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQ

EDIATYFCQQGNTLPPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 13 Secuencia codificadora de la región variable de la cadena pesada del mAb D10 anti-ROR1 de ratón:

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGACTCTGTCCATCAC
TTGCACTGTCTCTGGGTT

TTCATTAACCAGTTATGGTGTACACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGC
TGGGAGTAATATGGGCTG

GTGGATTACAAATTATAATTCTGGCTCTCAAGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACTCC
AAGAGCCAAGTTCTCTTA

AAAATGACCAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAGGAGAGGTAGTTC
CTATTCTATGGACTATTG

GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

10 SEQ ID NO: 14: Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena pesada del mAb D10 anti-ROR1 de ratón:

QVQLKESGPGLVAPSQTLSTCTVSGFSLTSYGVHWRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYNSA
LKSRLSISKDNSKSKSVLL

KMTSLQTDDETAMYYCARRGSSYSMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 15 Secuencia codificadora de la región variable de la cadena ligera del mAb D10 anti-ROR1 de ratón:

GAAATTGTGCTCTCTCAGTCTCCAGCCATCACAGCTGCATCTCTGGGCCAAAAGGTCACCAT
CACCTGCAGTGCCAGTTC

AAATGTAAGTTACATCCACTGGTACCAGCAGAGGTCAGGCACCTCCCCAGACCATGGATTT
ATGAAATATCCAACTGG

CTTCTGGAGTCCCAGTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATC
AGCAGCATGGAGGCTGAA
GATGCTGCCATTTATTATTGTCAGCAGTGAATTATCCTCTTATCACGTTTCGGCTCGGGGAC
AAAGTTGGAAATACAA

5 SEQ ID NO: 16 Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena ligera del mAb D10 anti-ROR1 de ratón:

EIVLSQSPAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWHYQQRSGTSPRPWIYEISKLASGVPVRFSS
GSGSGTSYSLTISSMEAE

DAAIYYCQWNYPLITFGSGTKLEIQ

SEQ ID NO: 17: Secuencia codificadora de la región variable de la cadena pesada de los mAb H10 y G11 anti-ROR1 de ratón:

GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATT

CACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGACAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGG
TCGCTTCCATTAGTACTG

GTGCTAGCGCCTACTTTCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGATAATGCC
AGGAACATCCTGTACCTG

CAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTATTGTGCAAGGATTACTACGTC
TACCTGGTACTTCGATGT

CTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

10 SEQ ID NO: 18: Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena pesada de los mAb H10 y G11 anti-ROR1 de ratón:

EVKLIVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISTGASAYFPDS
VKGRFTISRDNARNILYL

QMSSLRSEDAMYYCARITTSTWYFDVWGAGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 19: Secuencia codificadora de la región variable de la cadena ligera de los mAb H10 y G11 anti-ROR1 de ratón:

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCA
GGACATTAATAGTTATTTAAGCTGGTTCAGCAGAAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGA
TCTATCGTGCAAACAGAT
TGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACC
ATCAGCAGCCTGGAGTAT
GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG
GACCAAGCTGGAAATAAA

AC

- 5 SEQ ID NO: 20: Secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena ligera de los mAb H10 y G11 anti-ROR1 de ratón:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYSLTISSLEY
EDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK

- 10 En un aspecto de la descripción, se proporcionan anticuerpos en los que una cadena pesada está codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera está codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 15.

En otro aspecto un anticuerpo de la presente descripción contiene una cadena pesada codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3.

- 15 En aspectos adicionales de la descripción se proporcionan anticuerpos que tienen una cadena pesada codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 5 y una cadena ligera codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 7 o por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 11; o por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 17.

- 20 En otro aspecto de la descripción se proporcionan anticuerpos que contienen una cadena pesada con la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera con la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 16.

En otro aspecto de la descripción se proporcionan anticuerpos que contienen una cadena pesada con la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera con la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 4.

- 25 En un aspecto de la descripción se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo que se une específicamente a la proteína ROR1 que (a) comprenden una región de cadena pesada codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90% con cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo consistente en las SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13 o 17, (b) comprenden una región de cadena ligera correspondiente codificada por polinucleótidos que tienen al menos una identidad de secuencia de al menos 90% con cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo consistente en las SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15 o 19 y (c) se unen específicamente a cualquiera del extremo 3' o la porción central de la región similar a Ig del dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana o de murino.
- 30

También se proporcionan en el contexto de la invención anticuerpos que se unen a residuos en el centro de la región similar a Ig del dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana o de murino (aminoácidos 1-147 en la molécula humana). En un aspecto de la descripción, los anticuerpos de la presente descripción se unen a los aminoácidos 70-130 de la ROR1 humana. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen 4A5, G11, H10 y G3.

También se describe en la presente memoria dentro del contexto de la invención, que un residuo correspondiente al encontrado en el dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana en la posición 111 es crítico para la actividad de unión de los anticuerpos.

Se proporcionan adicionalmente dentro del contexto de la invención anticuerpos que se unen a residuos en la región 3' similar a Ig y la región enlazadora entre el dominio similar a Ig y el dominio CRD de la proteína ROR-1 humana o de murino (aminoácidos 1-165 en la molécula humana). En un aspecto, los anticuerpos de la presente descripción se unen a los aminoácidos 130-165 de la ROR1 humana. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen D10, F2, F12 y G6.

Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos se unen a un residuo de ácido glutámico correspondiente al encontrado en el dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana en la posición 138.

Como alternativa o adicionalmente, un residuo correspondiente al encontrado en el dominio extracelular de la proteína ROR1 humana en la posición 138 es crítico para la actividad de unión de los anticuerpos.

Como alternativa o adicionalmente, el anticuerpo codificado tiene actividad *in vivo* en la reducción de la carga de células leucémicas o linfómicas en un modelo animal aceptado en la técnica a una tasa de 2-8 veces, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces la del anticuerpo anti-ROR1 humano de tipo natural o anticuerpo monoclonal 4A5 (descrito en la presente memoria).

Como alternativa, o adicionalmente, el anticuerpo codificado tiene actividad *in vivo* en la inhibición de la expansión de linfocitos B leucémicos CD5^{dull}B220⁺ y ROR1^{bright}B220⁺.

Como alternativa o adicionalmente, el anticuerpo codificado se internaliza en células leucémicas o linfómicas a una tasa de al menos 2 veces, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces la del anticuerpo monoclonal 4A5. Tales anticuerpos son particularmente útiles como vehículos para el suministro de fármaco a una célula diana.

Un ejemplo de un anticuerpo que posee todas las características funcionales anteriormente mencionadas es D10, que tiene una región de cadena pesada codificada por la SEQ ID NO: 13 y una región de cadena ligera codificada por la SEQ ID NO: 15.

En otro aspecto de la descripción, se proporcionan polipéptidos que consisten o comprenden anticuerpos que se unen específicamente a la proteína ROR1 y (a) comprenden una región de cadena pesada que tiene al menos una identidad de secuencia de al menos 90% con cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14 o 18, (b) comprenden una región de cadena ligera correspondiente que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16 o 20 y (c) se unen específicamente a cualquiera del extremo 3' o la porción central de la región similar a Ig del dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana o de murino. En un aspecto de la descripción, el polipéptido aislado es un anticuerpo. En un aspecto adicional de la descripción, el polipéptido es un Fab o F(ab)².

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente descripción puede contener adicionalmente un marcador detectable. Tales marcadores son conocidos en la técnica e incluyen radioisótopos y marcadores fluorescentes. Como tal, la internalización de un compuesto que evidencie el paso mediante transportadores puede ser detectado detectando una señal desde dentro de una célula de cualquiera de una variedad de indicadores. El indicador puede ser un marcador, tal como un fluoróforo, un cromóforo o un radioisótopo. Puede usarse también la formación de imágenes confocales para detectar la internalización de un marcado, ya que proporciona suficiente resolución espacial para distinguir entre fluorescencia sobre una superficie celular y fluorescencia dentro de una célula; como alternativa, se puede usar la formación de imágenes confocales para rastrear el movimiento de los compuestos con el tiempo. En otro enfoque, se detecta la internalización de un compuesto usando un indicador que es un sustrato de una enzima expresada dentro de una célula. Una vez se internaliza el complejo, el sustrato es metabolizado por la enzima y genera una señal óptica o descomposición radiactiva que es indicativa de la captación. La emisión de luz puede monitorizarse por instrumentos comerciales basados en PMT o por sistemas de formación de imágenes basados en CCD. Además, se emplean también procedimientos de ensayo que utilizan detección por LCMS de los compuestos transportados o de señales electrofisiológicas indicativas de la actividad de transporte.

En ciertos aspectos terapéuticos de la descripción, el anticuerpo seleccionado se puede administrar solo, en combinación con otro anticuerpo de la invención o con uno o más agentes terapéuticos combinatorios para tratar un cáncer de ROR-1. Cuando se administran uno o más de los anticuerpos descritos en la presente memoria como agentes terapéuticos, pueden ejercer un efecto beneficioso en el sujeto mediante una variedad de mecanismos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se purifican anticuerpos que se unen específicamente a ROR1 y se administran a un paciente para neutralizar una o más formas de ROR1, para bloquear una o más actividades de ROR1 o para bloquear o inhibir una interacción de una o más formas de ROR1 con otra biomolécula; por ejemplo, para tratar LLC u otros cánceres de ROR1. Todos los procedimientos terapéuticos mencionados se practican por suministro de una dosificación terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene los anticuerpos y agentes terapéuticos, que puede ser determinados por un farmacólogo o facultativo especialista en inmunoterapia de cáncer humano.

En un aspecto la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de cáncer mediante la administración, a un sujeto humano que lo necesita, de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

5 En otro aspecto la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de cáncer que comprende la administración, a un sujeto humano que necesita, de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

10 Ventajosamente, los métodos de la descripción proporcionan una reducción de la carga de células leucémicas o linfómicas (como se demuestra en y equivalente a un modelo animal aceptado en la técnica) de 2-8 veces, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces la del anticuerpo anti-ROR1 humano de tipo natural o anticuerpo monoclonal 4A5 (descrito en la presente memoria).

Los métodos de la descripción proporcionan adicionalmente un enfoque terapéutico para inhibir la expansión de linfocitos B leucémicos CD5^{dull}B220⁺ y ROR1^{bright}B220⁺.

15 Como se estudia en la presente memoria, los anticuerpos de la invención pueden incluir anticuerpos humanizados y se pueden combinar para uso terapéutico con ingredientes activos o inertes adicionales, por ejemplo, en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales, por ejemplo, adyuvantes inmunogénicos, y opcionalmente con moléculas complementarias o combinatoriamente activas, tales como fármacos antiinflamatorios y antifibrinolíticos. Los anticuerpos que se internalizan fácilmente en células, como se demuestra en la presente memoria con respecto al anticuerpo D10, son también de uso particular como vehículos para el suministro de fármacos a células diana (por ejemplo, como se muestra en las Figuras 21-23). Los especialistas en la técnica 20 estarán familiarizados con métodos para la producción de conjugados de anticuerpo-fármaco útiles en tales protocolos de suministro de fármaco.

Al llevar a cabo diversos métodos de ensayo, de diagnóstico y terapéuticos de la invención, es deseable preparar por adelantado kits que comprenden una combinación de anticuerpos como se describen en la presente memoria con otros materiales. Por ejemplo, en el caso de inmunoensayos enzimáticos de tipo sándwich, los kits de la descripción pueden contener un anticuerpo que se une específicamente a ROR1 unido opcionalmente a un vehículo apropiado, una preparación liofilizada o una solución de un anticuerpo monoclonal marcado con enzima que se puede unir al mismo antígeno junto con el anticuerpo monoclonal o de un anticuerpo policlonal marcado con la enzima de la misma manera, una solución patrón de ROR1 purificada, una solución tampón, una solución de lavado, pipetas y un recipiente de reacción. Además, los kits incluyen opcionalmente materiales de etiquetado y/o explicativos que proporcionan instrucciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos descritos en la presente memoria en un entorno de ensayo. Los materiales explicativos comprenden típicamente materiales escritos o impresos. Se contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM). Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que 35 proporcionan tales materiales explicativos.

40 En general, un método *in vitro* de diagnóstico de un cáncer de ROR-1 comprenderá poner en contacto las presuntas células cancerosas de un sujeto humano con un anticuerpo de acuerdo con la invención, y detectar la unión con ROR-1 expresada en dichas células en comparación con la expresión en células no cancerosas humanas post-embriónicas. Todos los dichos métodos de diagnóstico se practican mediante el suministro de una cantidad con efecto de diagnóstico de anticuerpos de acuerdo con la invención, que puede ser determinada por un especialista en diagnóstico o ingeniero de diagnóstico *in vivo* especializado en el diagnóstico de cáncer humano.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar la invención.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales anti-ROR1

45 Para la producción de mAbs generados por hibridoma, se inocularon ratones con ADN, proteína y construcciones adenovirales que expresan la porción extracelular (AA 1-406) de la proteína ROR1 que incluye los dominios similares a Ig, CRD y Kringle y regiones enlazadoras adyacentes (Figuras 10-11). Debido al alto grado de homología entre las moléculas de murino y humanas, se coinyectaron una variedad de citoquinas y agentes inmunoestimulantes, tales como adyuvante completo de Freund, para maximizar la generación de anticuerpos anti-ROR1 humana. Se generaron mAbs generados por hibridoma y se seleccionó la unión a ROR1 humana y de murino. 50 Un ejemplo de mAb derivados de hibridoma es D10.

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos anti-ROR1 usando presentación de fagos

Se generó un segundo conjunto de anticuerpos mediante el uso de una colección de fago mejorada patentada (Alere, Inc. San Diego). Estos anticuerpos anti-ROR1 humana se unen a epítopos que cubren toda la longitud del dominio extracelular de la proteína ROR1 (Figura 12). Un ejemplo de un anticuerpo anti-ROR1 derivado de presentación de fago es 4A5. 55

Ejemplo 3: Análisis in vitro de anticuerpos anti-ROR1

Se seleccionaron los anticuerpos generados por hibridomas o presentación de fagos para la unión a ROR1 humana y de murino. Se determinó que los anticuerpos D10 y 4A5 anti-ROR1 se unían solo a ROR1 humana y no reaccionaban de forma cruzada con ROR1 de murino.

5 Ejemplo 4: Determinación de los sitios de unión para anticuerpos anti-ROR1

Debido a que los mAb anti-ROR1 son específicos de especie, se generaron una serie de proteínas quiméricas que se usaron para determinar el sitio de unión de cada uno de los mAb anti-ROR1 (Figura 13). Como selección de segundo nivel, se generó una serie de construcciones por delección para determinar el dominio extracelular de ROR1 real al que se unen los mAb. Una vez se identificó el dominio de unión, se generaron moléculas de ROR1 quiméricas truncadas para identificar subregiones específicas que son reconocidas por los mAb anti-ROR1 humana (Figura 14). Como etapa final, se determinaron los aminoácidos reales diana de estos anticuerpos. Para esta selección final, se generaron aminoácidos humanos murinizados en los fragmentos de subdominio para determinar los residuos críticos requeridos para la unión de mAb (Figura 15). A partir de este paradigma de selección, se determinaron los subdominios de unión para los mAb (Figura 15). Se determinó que el mAb D10 anti-ROR1 humana requería el residuo de ácido glutámico en la posición 138 para unirse al dominio similar a Ig de la molécula de ROR1 humana. Cuando se reemplaza este aminoácido por el residuo de lisina de la molécula de murino, la molécula D10 ya no se une a la proteína ROR1.

De manera similar, se determinó que el mAb 4A5 anti-ROR1 humana requería el residuo de isoleucina en la posición 111 se uniera a la molécula de ROR1 humana (Figura 24). Cuando se reemplaza este aminoácido por el residuo de asparagina de la molécula de murino, la molécula 4A5 ya no se une a la proteína ROR1. Se determinó también que los anticuerpos G11, H10 y G3 anti-ROR1 se unen a la misma región que 4A5.

Usando técnicas estándares de bloqueo cruzado, se determinaron los sitios de unión para los anticuerpos F2, F12 y G6 anti-ROR1. Estos experimentos determinaron que los anticuerpos F2, F12 y G6 bloquean de forma cruzada el anticuerpo D10 anti-ROR1, indicando que comparten un sitio de unión.

25 Ejemplo 5: Determinación de los valores de K_D para los anticuerpos D10 y 4A5 anti-ROR1

Se determinaron los valores de K_D para los anticuerpos anti-ROR1 usando técnicas estándares. Se determinó que la K_D para el anticuerpo D10 era 40 nM y para el anticuerpo 4A5 era 4 nM (Figuras 16A y B).

Ejemplo 6: Análisis *in vivo* de anticuerpos anti-ROR1

Se valoró el mAb D10 en varios modelos *in vivo*. En un modelo de actividad dependiente del nicho xenográfico *in vivo* de murino, se administraron dos dosis de mAb a 10 mg/kg contra 4 células de LLC de paciente primario en 76 ratones. Como se muestra en la Figura 17, el mAb D10 eliminaba sustancialmente las células de LLC del paciente de manera dependiente de la dosis. En contraposición, el mAb 4A5 tuvo una actividad mínima en estos estudios, aunque el kDa de este mAb sea 10 veces mayor (4 frente a 40) que para el mAb D10.

Además de este modelo de actividad, se ensayó también el mAb D10 en un modelo de ratón transgénico inmunocompetente que genera espontáneamente células leucémicas que expresan la proteína ROR1 humana (Figuras 18-20). Se administraron los mAb D10 y 4A5 específicos de ROR1 o anticuerpos IgG de control (10 mg/kg) antes y después de la transferencia adoptiva de linfocitos B ROR1xTCL1 LLC en ratones Balb C. El mAb D10, pero no el IgG de control ni 4A5, era capaz de inhibir el desarrollo y expansión de linfocitos B leucémicos ROR1xTCL en la sangre de animales receptores hasta dos semanas después de recibir la última infusión de mAb.

Junto con la actividad antileucémica de este mAb, se ha demostrado también que el anticuerpo D10 anti-ROR1 se internaliza en células de LLC de paciente y líneas celulares de leucemia y linfoma de linfocitos B a una mayor tasa y grado que otros mAb anti-ROR1 que se unen a otros sitios antígenicos en la porción extracelular de la proteína ROR1 (Figuras 21-23). Debido a la ausencia de la proteína ROR1 en tejidos postparto y a su rápida tasa de internalización, el mAb D10 puede servir como una excelente proteína portadora para fármacos; por ejemplo, para uso en citotoxicidad dirigida mediada por el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Basándose en estos hallazgos preclínicos, el mAb D10 tiene potencial para tener actividad terapéutica contra leucemias, linfomas y cánceres tumorales sólidos que expresan ROR1 como terapia dirigida y/o vehículo de fármaco conjugado.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS CONTRA LA PROTEÍNA ROR-1 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> DLA14825PCTEPD1

<140> EP12734733.4

<141> 13-01-2012

<150> US 61/433,043

<151> 14-01-2011

<160> 37

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 357

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 1

gaagtgaaac tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgccca tgtcttgggt tcgccagatt 120

ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtctgtg gtggtaccac ctactatcca 180

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacat cctgtacctg 240

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtggaag atatgattac 300

gacgggtact atgcaatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 2

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

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

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

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

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

ES 2 758 533 T3

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly
85 90 95

Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 322
<212> ADN
<213> Ratón

<400> 3
gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
atcacttgca aggcgagtc ggacattaat agctatttaa gctgggtcca gcagaaacca 120
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggttgatgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcggtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcaacag cctggagtat 240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgaat ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaatgaa ac 322

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Ratón

<400> 4
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 357
<212> ADN
<213> Ratón

<400> 5

ES 2 758 533 T3

gaggtccagc tacagcagtc tggacctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg cttctggttt cgcattcact ggctacaaca tgaactgggt gaaacagacc 120
 aatggaaaga gccttgagtg gattggaagt attgatcctt actatggtgg ttctacctac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactca agagcctcac atctgatgac tctgcagtct attactgtgc aagatccccg 300
 gggggggact atgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Ratón

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ala Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 322
 <212> ADN
 <213> Ratón

<400> 7
 gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctgtaggaga gagagtcact 60
 atcacttgta aggcgagtc gggcattaat agctattcag gctggttcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatttatcgt ggaaatagat tgggtggatgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa ac 322

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT

ES 2 758 533 T3

<213> Ratón

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 9

<211> 354

<212> ADN

<213> Ratón

10

<400> 9

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctgggacttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caacttcacc aactactgga taaactgggt gaagctgagg 120

cctggacaag gccttgagt gattggagaa atttatcctg gtagtggttag tactaattac 180

aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgcagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcaactca gcagcctggc atctgaagac tctgctctct attactgtgc aagagatggt 300

aactactatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

15

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Ratón

20

<400> 10

ES 2 758 533 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Asn Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 325
<212> ADN
<213> Ratón

<400> 11
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca acagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcagcat tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggaacaa 240
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttcctccgta cacgttcgga 300
ggggggacca agctggaaat aaaac 325

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Ratón

<400> 12

ES 2 758 533 T3

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

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

<210> 13
<211> 351
5 <212> ADN
<213> Ratón

<400> 13
cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagac tctgtccatc 60
acttgccactg tctctgggtt ttcattaacc agttatggtg tacactgggt tcgccagcct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatgggctg gtggattcac aaattataat 180
tcggctctca agtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttctctta 240
aaaatgacca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag gagaggtagt 300
tcctattcta tggactattg gggcaagga acctcagtca ccgtctctc a 351

10 <210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> Ratón

15 <400> 14

ES 2 758 533 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 318
<212> ADN
<213> Ratón

<400> 15
gaaattgtgc tctctcagtc tccagccatc acagctgcat ctctgggcca aaaggtcacc 60
atcacctgca gtgccagttc aaatgtaagt tacatccact ggtaccagca gaggtcaggc 120
acctcccca gaccatggat ttatgaaata tccaaactgg cttctggagt cccagttcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcc tttattattg tcagcagtggt aattatcctc ttatcacgtt cggctcgggg 300
acaaagttgg aaatacaa 318

<210> 16
<211> 106
<212> PRT
<213> Ratón

<400> 16
Glu Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

ES 2 758 533 T3

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

His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Thr Ser Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
100 105

<210> 17
<211> 354
<212> ADN
<213> Ratón

<400> 17
gaagtgaagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgccca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcttcc attagtactg gtgctagcgc ctactttcca 180
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctgtacctg 240
caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt attgtgcaag gattactacg 300
tctacctggt acttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> Ratón

<400> 18
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

ES 2 758 533 T3

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

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

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

Arg Ile Thr Thr Ser Thr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 322
<212> ADN
<213> Ratón

<400> 19
gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
atcacttgca aggcgagtc ggacattaat agttatttaa gctgggtcca gcagaaacca 120
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa ac 322

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Ratón

<400> 20
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 21

- <211> 106
<212> PRT
<213> Ratón
- 5 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 10 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 15 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (60)..(62)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 20 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 25 <400> 21
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Gly Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa
20 25 30

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Arg Gly Xaa Xaa Xaa Gly Thr
50 55 60

Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Asp Asn Val Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg
100 105
- 30 <210> 22
<211> 106
<212> PRT
<213> Ratón
- 35 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 40 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 45 <220>
<221> característica miscelánea

<222> (60)..(62)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 5 <221> característica miscelánea
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 22
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Gly Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys
 35 40 45

Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Xaa Xaa Xaa Ser Tyr
 50 55 60

Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80

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

10 Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105

<210> 23
 <211> 106
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(10)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (31)..(34)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (60)..(61)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (73)..(73)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 23

ES 2 758 533 T3

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Xaa Xaa Ser Ser Thr
50 55 60

Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105

<210> 24
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
15 <222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (60)..(61)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
25 <222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 24

ES 2 758 533 T3

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

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ala Phe Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Asn Gly Lys
35 40 45

Ser Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Asp Pro Tyr Xaa Xaa Tyr Gly Gly
50 55 60

Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Xaa Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val
65 70 75 80

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

Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105

<210> 25
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
15 <222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (60)..(63)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
25 <222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 25

ES 2 758 533 T3

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

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Thr Asp Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys
35 40 45

Ser Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
50 55 60

Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Xaa Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val
65 70 75 80

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

Ser Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105

<210> 26
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
15 <222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (60)..(61)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
25 <222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 26

ES 2 758 533 T3

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
35 40 45

Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Xaa Xaa Ser Gly Gly
50 55 60

Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Xaa Gly Arg Val Thr Met Thr Arg
65 70 75 80

Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser
85 90 95

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105

<210> 27
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
15 <222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (60)..(61)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
25 <222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 27
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Xaa Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

30

ES 2 758 533 T3

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

Xaa Xaa Thr Asn Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln
35 40 45

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Xaa Xaa Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Xaa Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala
65 70 75 80

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

Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105

<210> 28
<211> 106
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (60)..(61)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 28
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Xaa Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Thr Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln

ES 2 758 533 T3

	35		40		45											
	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Xaa	Xaa	Ser	Gly	Ser
	50					55						60				
	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Xaa	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val
	65					70					75					80
	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser
					85					90						95
	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg						
				100					105							
	<210>	29														
	<211>	106														
5	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<220>															
	<221>	característica miscelánea														
10	<222>	(10)..(10)														
	<223>	Xaa puede ser cualquier aminoácido natural														
	<220>															
	<221>	característica miscelánea														
15	<222>	(31)..(34)														
	<223>	Xaa puede ser cualquier aminoácido natural														
	<220>															
	<221>	característica miscelánea														
20	<222>	(60)..(61)														
	<223>	Xaa puede ser cualquier aminoácido natural														
	<220>															
	<221>	característica miscelánea														
25	<222>	(73)..(73)														
	<223>	Xaa puede ser cualquier aminoácido natural														
	<400>	29														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Xaa	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly
	1			5					10						15	
	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Xaa	Xaa
				20					25					30		
	Xaa	Xaa	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln
			35					40					45			
	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Asn	Pro	Ser	Xaa	Xaa	Gly	Gly	Ser
	50					55						60				
30	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Xaa	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg
	65					70					75					80
	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser
					85					90						95
	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg						
				100					105							

<210> 30
 <211> 106
 <212> PRT
 5 <213> Ratón

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(10)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (31)..(34)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (60)..(62)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (73)..(73)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <400> 30
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Gly Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15

 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa
 20 25 30

 Xaa Xaa Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys
 35 40 45

 Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly Xaa Xaa Xaa Ala Ser
 50 55 60

 Thr Tyr Phe Pro Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80

 Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser
 85 90 95

 Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105
 30

 <210> 31
 <211> 106
 <212> PRT
 35 <213> Ratón

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(10)
 40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (31)..(34)
 45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (60)..(61)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 5
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 10
 <400> 31
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Gly Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys
 35 40 45
 Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Xaa Xaa Gly Ala Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser
 85 90 95
 Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105
 15
 <210> 32
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 25
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (31)..(34)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 30
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (60)..(61)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 35
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <400> 32

ES 2 758 533 T3

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Xaa Xaa Gly Gly Ser
50 55 60

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

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

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
100 105

<210> 33
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
15 <222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (60)..(62)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
25 <222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 33

ES 2 758 533 T3

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

Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Xaa Xaa Xaa Gly Phe
50 55 60

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Xaa Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys
65 70 75 80

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Leu Leu Lys Met Thr Ser Leu Gln Thr
85 90 95

Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105

<210> 34
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
15 <222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (60)..(62)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
25 <222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 34

ES 2 758 533 T3

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

Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Xaa Xaa Xaa Gly Ser
50 55 60

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Xaa Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys
65 70 75 80

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
85 90 95

Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105

<210> 35
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
15 <222> (31)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (60)..(62)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
25 <222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 35

ES 2 758 533 T3

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

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

Xaa Xaa Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Xaa Xaa Xaa Gly Ser
50 55 60

Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Xaa Ser Arg Val Thr Ile Ser Val
65 70 75 80

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
85 90 95

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105

<210> 36

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

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

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

Val Ser Gly Asn Pro Pro Pro Thr Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
85 90 95

ES 2 758 533 T3

Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Leu Ser Phe Arg Ser Thr Ile Tyr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Thr His Thr Phe Thr Ala Leu Arg Phe
 340 345 350

ES 2 758 533 T3

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

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
405

<210> 37

<211> 406

<212> PRT

<213> Murino

<400> 37

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Gln Glu Thr
20 25 30

Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Thr
35 40 45

Ser Ser Glu Ile Asp Lys Gly 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

Val Ser Gly Asn Pro Pro Pro Ser Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
85 90 95

Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Ile Ser Phe Arg Ala Thr Asn Tyr
100 105 110

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 Lys Val Val Ser Thr Thr Gly
130 135 140

Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Ser
145 150 155 160

5

10

ES 2 758 533 T3

Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile
 165 170 175
 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
 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
 Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Val Leu Glu
 245 250 255
 Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met
 260 265 270
 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
 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
 Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Ser 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
 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
 405

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar cáncer, que comprende poner en contacto supuestas células cancerosas obtenidas de un sujeto humano con un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína ROR1 y está constituido por una región de cadena pesada que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% con la SEQ ID NO: 14 y una región de cadena ligera correspondiente que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la SEQ ID NO: 16, y detectar la unión con ROR-1 expresada en dichas células, en donde el anticuerpo requiere para la unión un residuo de ácido glutámico correspondiente al encontrado en la posición 138 del dominio extracelular de la proteína ROR-1 humana.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma, LLC, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de linfocitos B de células marginales, linfoma de Burkett, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma espinocelular epitelial, melanoma, mieloma, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el cáncer es leucemia o linfoma.

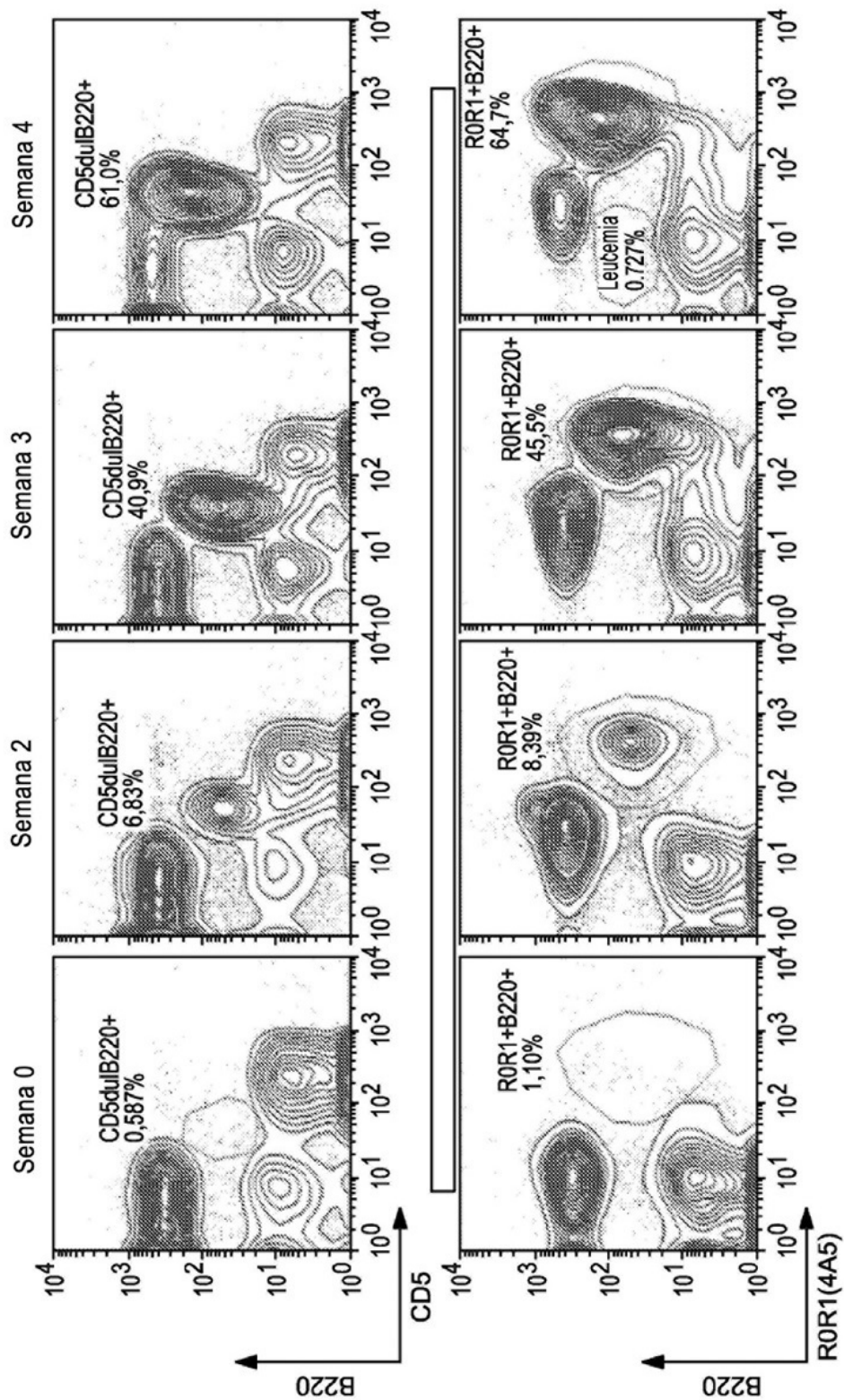


FIG. 1

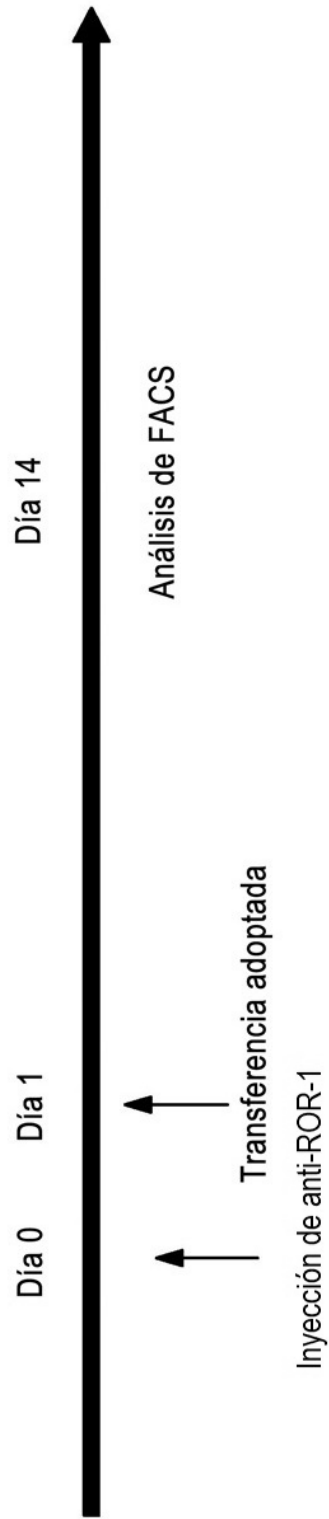


FIG. 2

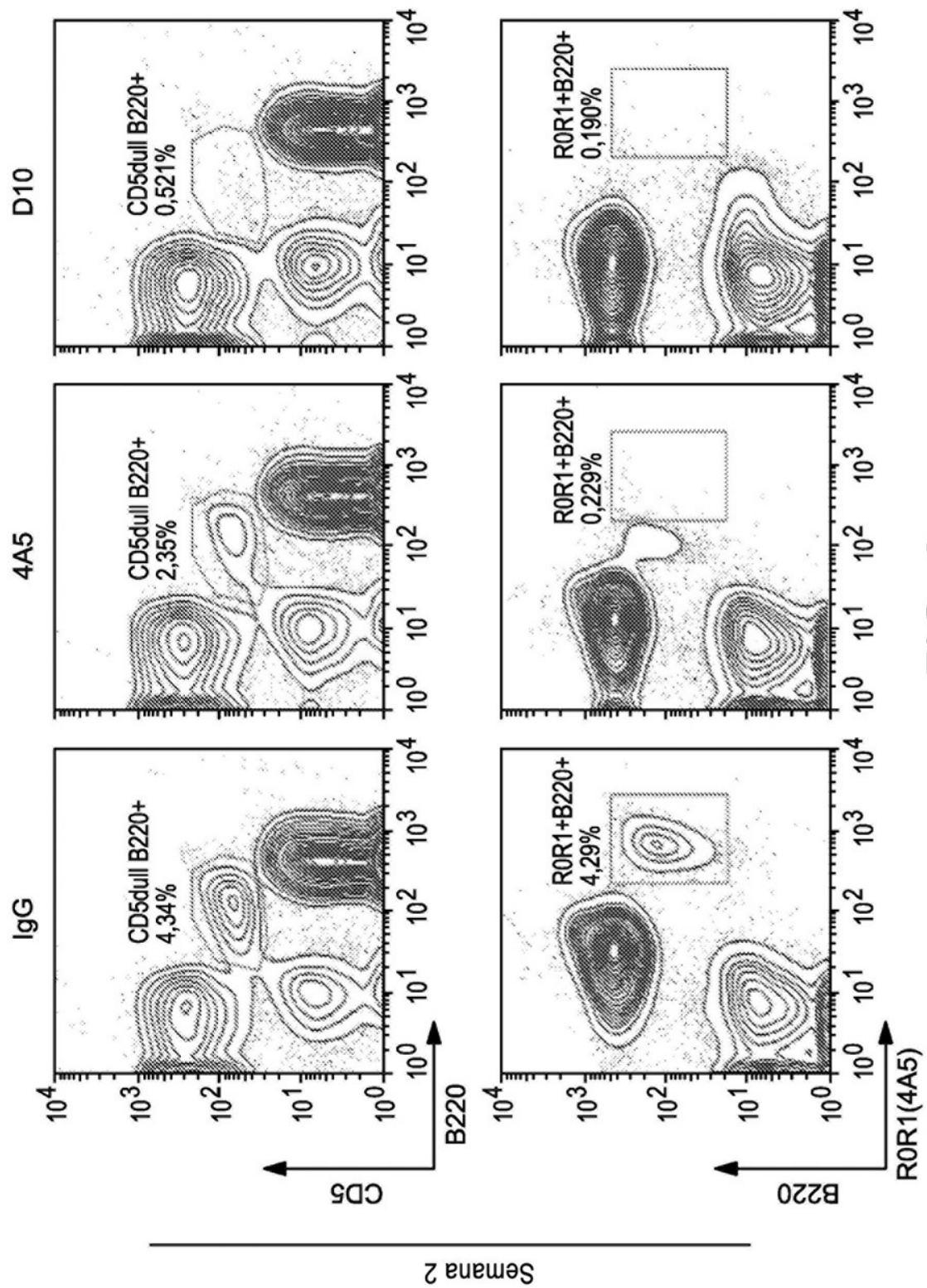


FIG. 3

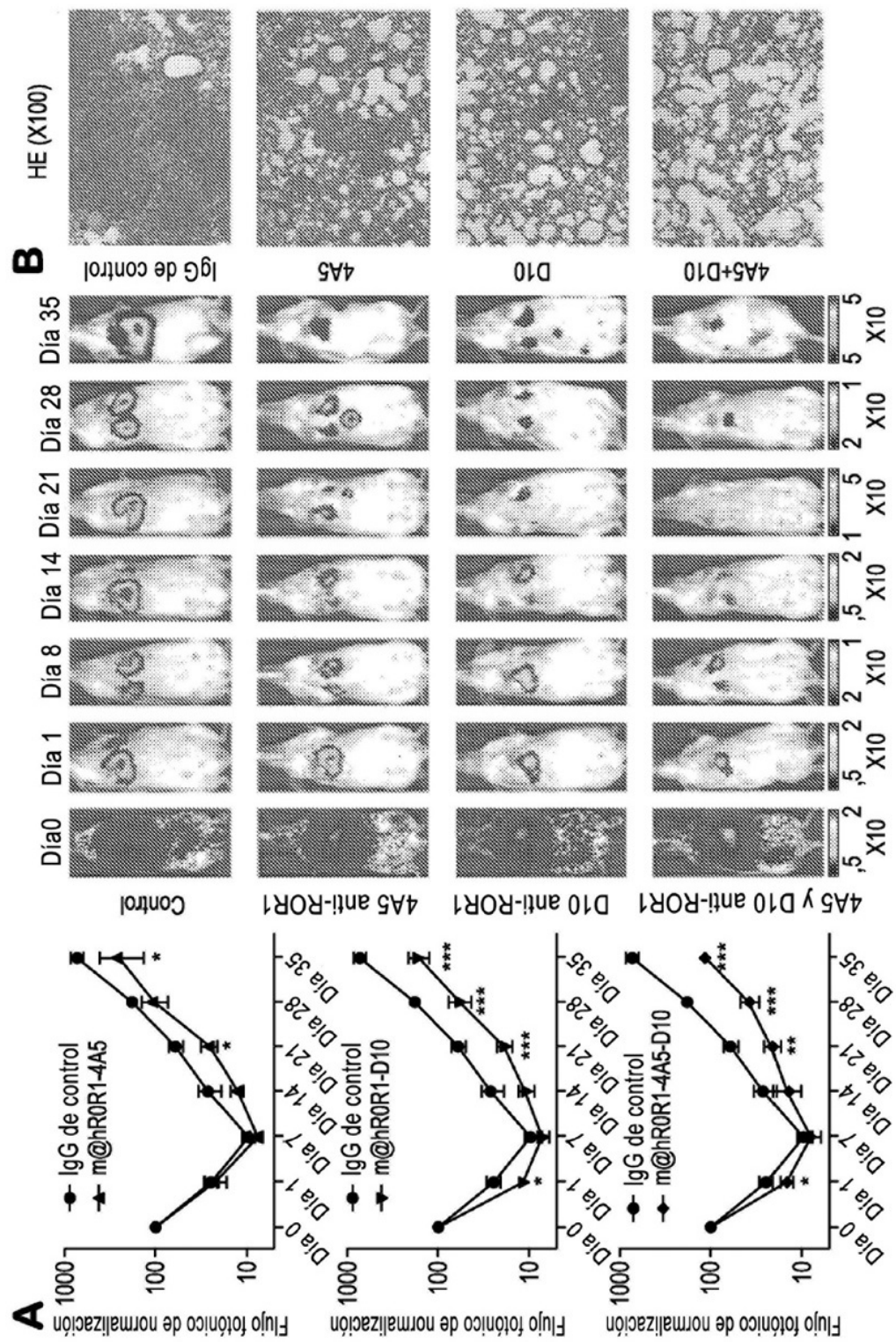


FIG. 4

Comparación de la cadena pesada de Ig 4A5 con la IGHV de ratón
y humana de línea germinal más cercana

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)		
	1	10	20	30	40	50			
4A5_VH	1								
	EVKL	VESGG	GLVK	PGSL	KLSCAAS	GFTF...	SSYA	MSWVR	QIPEKRL
MuIGHV5-09*02	..	..	..	..	..	..	..	..	..
HuIGHV3-48*01	..Q	..	..R	..	..S	..N	..A	..G	..SY
	CDR2-IMGT (56-65)			FR3-IMGT (66-104)					
	60	70	80	90	100				
4A5_VH	ISRG...	GTT	YYPDSVK	GRFTISRD	NVRN	ILYLQ	MSSLR	SEDTAM	YYCGR
MuIGHV5-09*02	..S	..SY	..	..	..A	..T	..	..	..L
HuIGHV3-48*01	..SS	..SS	..I	..AK	..S	..N	..A	..V	..A

FIG. 5

Comparación de la cadena pesada de Ig 2-G6 con la IGHV de
ratón y humana de línea germinal más cercana

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)		
	1	10	20	30	40	50			
2-G6_QED_VH	EVQLQSGP	ELEKPGASVKISCKAS	GFAF	...TGYN	MNWKQ	TNGKSLEWIGS			
MuIGHV1-39*01	.F	V		.YS	D	S			
HuIGHV1-02*02	Q	...V...A	VK.....V	...YT	Y	.H..R.AP.QG			
	CDR2-IMGT (56-65)			FR3-IMGT (66-104)					
	60	70	80	90	100				
G6_QED_VH	IDPY..YGG	S	TYNQKFK	DKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSD	DDSAVYYCAR				
MuIGHV1-39*01	.N.N..	TT	S	G	Q	N			
HuIGHV1-02*02	.N.N..S..T	N.A...	Q.GRV	M.R.T.I	E	.SR.R..T			

FIG. 6

Comparación de la cadena pesada de Ig 2-G3 con la IGHV de
ratón y humana de línea germinal más cercana

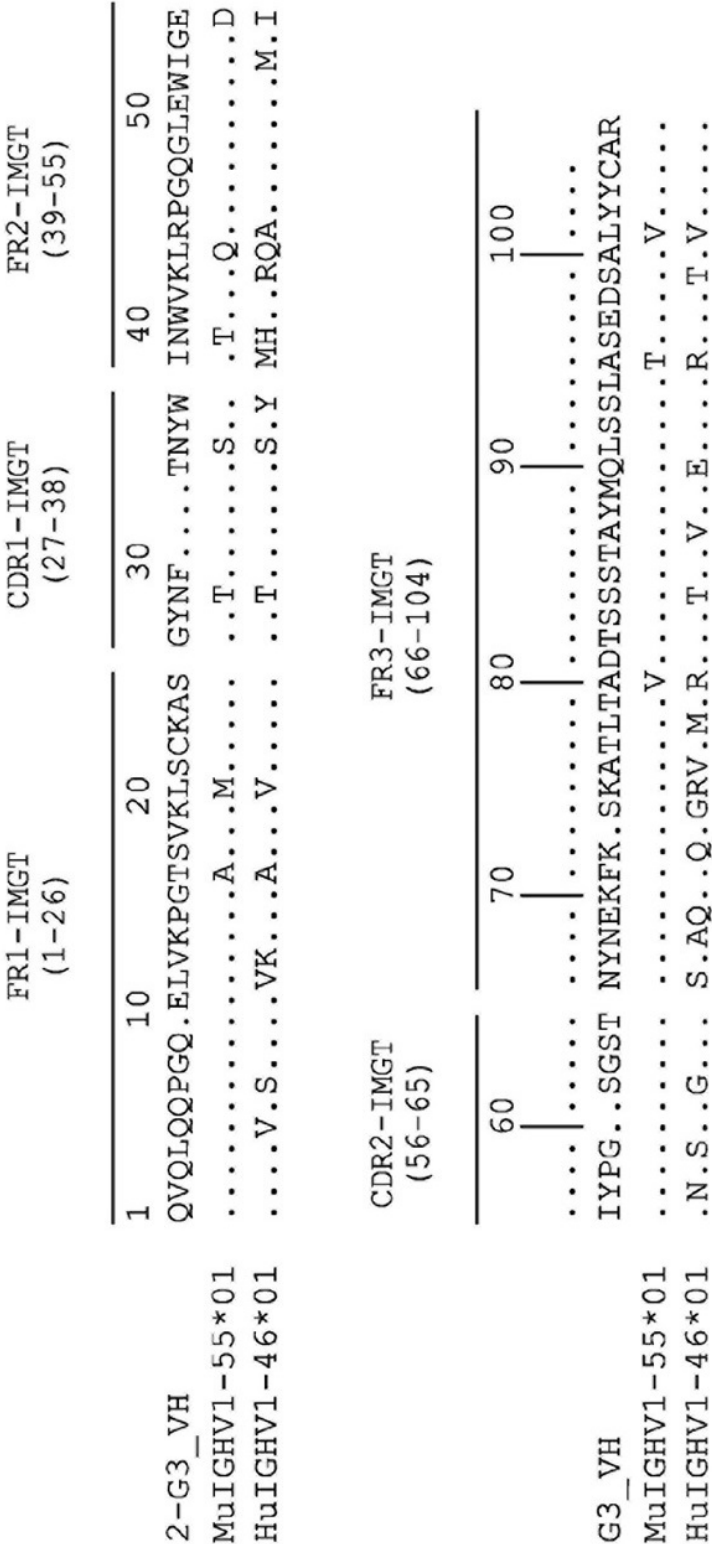


FIG. 7

Comparación de la cadena pesada de Ig 3-H10 con la IGHV de
ratón y humana de línea germinal más cercana

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)		
	1	10	20	30	40	50			
3-H10_VH	1								
	EVKL	VESGG	GLVK	PGGSLK	LSCAAS	GFAF...TGYN	MNVVKQ	TNGK	SLEWIGS
MuIGHV5-9*02				..A.....	..D	T			
HuIGHV3-23*04	..Q.....	Q.....	..R.....			A.G.G.....	SA		
	CDR2-IMGT (56-65)			FR3-IMGT (66-104)					
	60	70	80	90	100				
H10_VH	ISTG...	AST	YFPD	SVK	GRFTIS	RDNARNILYLQ	MSSLR	SEDTAM	YYCAR
MuIGHV5-9*02	..S...G...	..Y.....		T.....	L.....				
HuIGHV3-23*04	..GS..GG..	..YA.....	SK.T.....	..N...A...V....	..K				

FIG. 8

Comparación de la cadena pesada de Ig 3-D10 con la IGHV de
ratón y humana de línea germinal más cercana

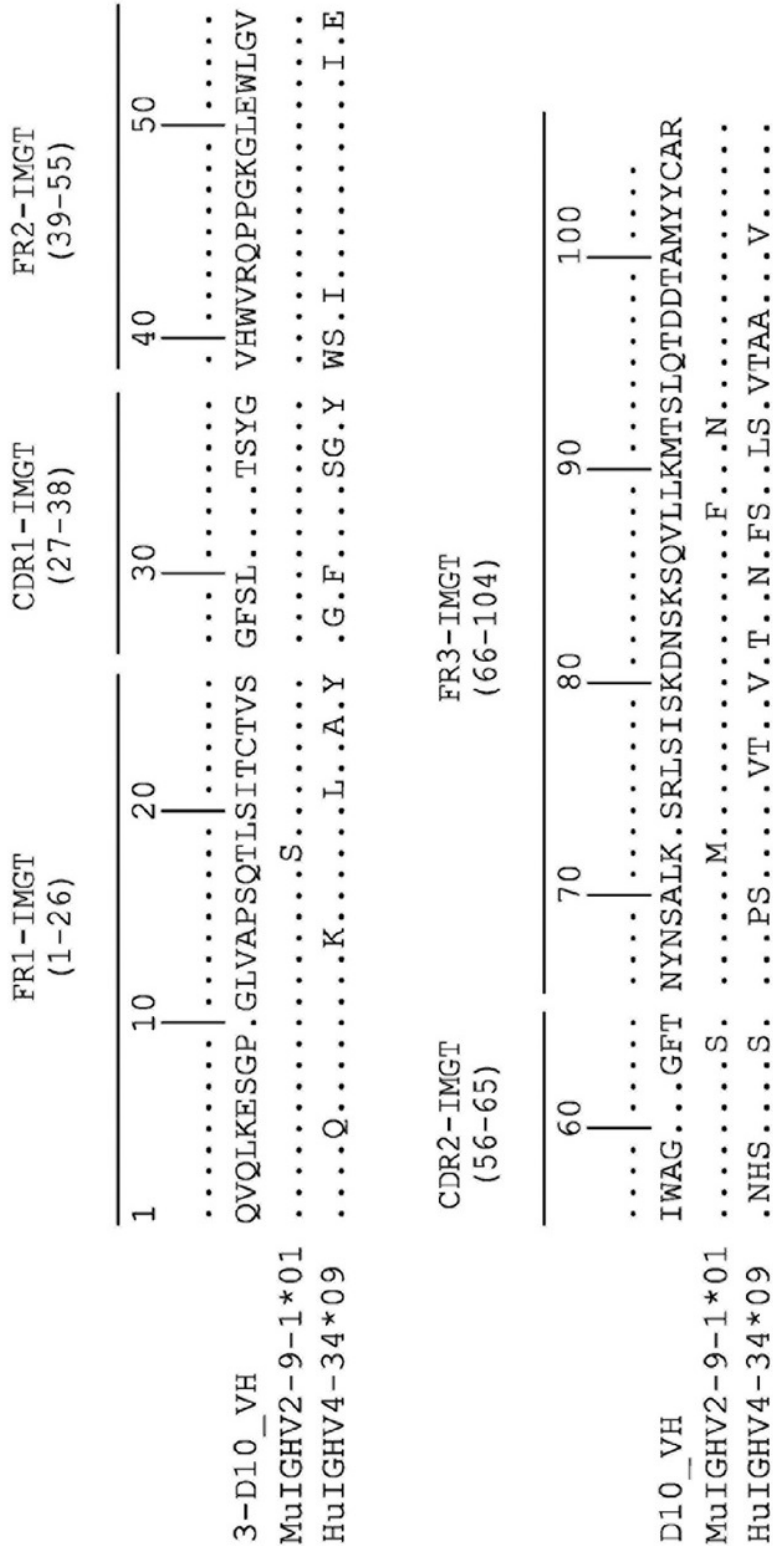
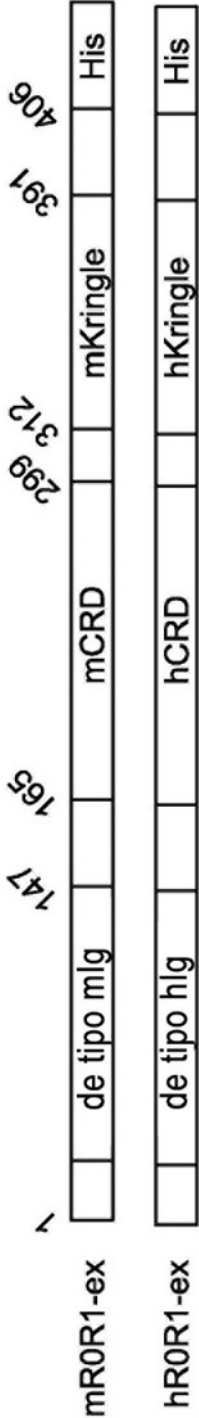


FIG. 9

Las proteínas ROR-1 humana y de murido están altamente conservadas



Región	Posición	nº de aa diferentes
Tipo lg	aa 1---147	12
Enlazador entre el tipo lg y CRD	aa 148---165	1
CRD	aa 166---299	1
Enlazador entre CRD y Kringle	aa 300---312	0
Kringle	aa 313---391	1
Enlazador entre Kringle y TM	aa 392---406	0

FIG. 10

Estructura del dominio y homología de secuencias de
la proteína extracelular ROR-1 humana y de murido

hR0R1	MHRPRRRGTRPPLLALLAARGAAQAQETELSVSAELVPTSSWNISSELNPKDSYLT	<u>LDPEPMNNITTSLGQTAE</u>	<u>LHCK</u>	80
mR0R1	P.....D.....T.....ID.G.....			
hR0R1	VSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEP	RRLSFRSTIYGSRLRIRNLD	TTDTGTGYFQCVATNGKEVVS	STGVL
mR0R1	S.....I...A.N.....K...T.....			160
		Dominio de Ig		
hR0R1	SDEYEE	DFCQPYRGIACARFIGNR	TVYMESLHMQGEIENQITAAFT	MIGTSSHLSDKCSQFALPSLCHYAF
mR0R1				
		Dominio rico en cisteína		
hR0R1	VPKPRDL	CRDECEILENVLCQTEYIFAR	SNPMILMRLKLPNCEDLPQ	PESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYN
mR0R1	V.....			
hR0R1	YRGTVSVTKSGRQCQ	PWNSQYPHTHTFTALRFP	ELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFT	LDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKN
mR0R1	S.....			
hR0R1	KMEILY			
mR0R1				

FIG. 11

mAb anti-ROR-1 generados a lo largo del dominio extracelular

Sitios de unión de anticuerpos						
Nº	5' de tipo Ig	En medio de tipo Ig	3' de tipo Ig	CRD	Kringle	
1-4A5		✓				
G11		✓				
H11		✓				
2G3		✓				
3-D10			✓			

FIG. 12

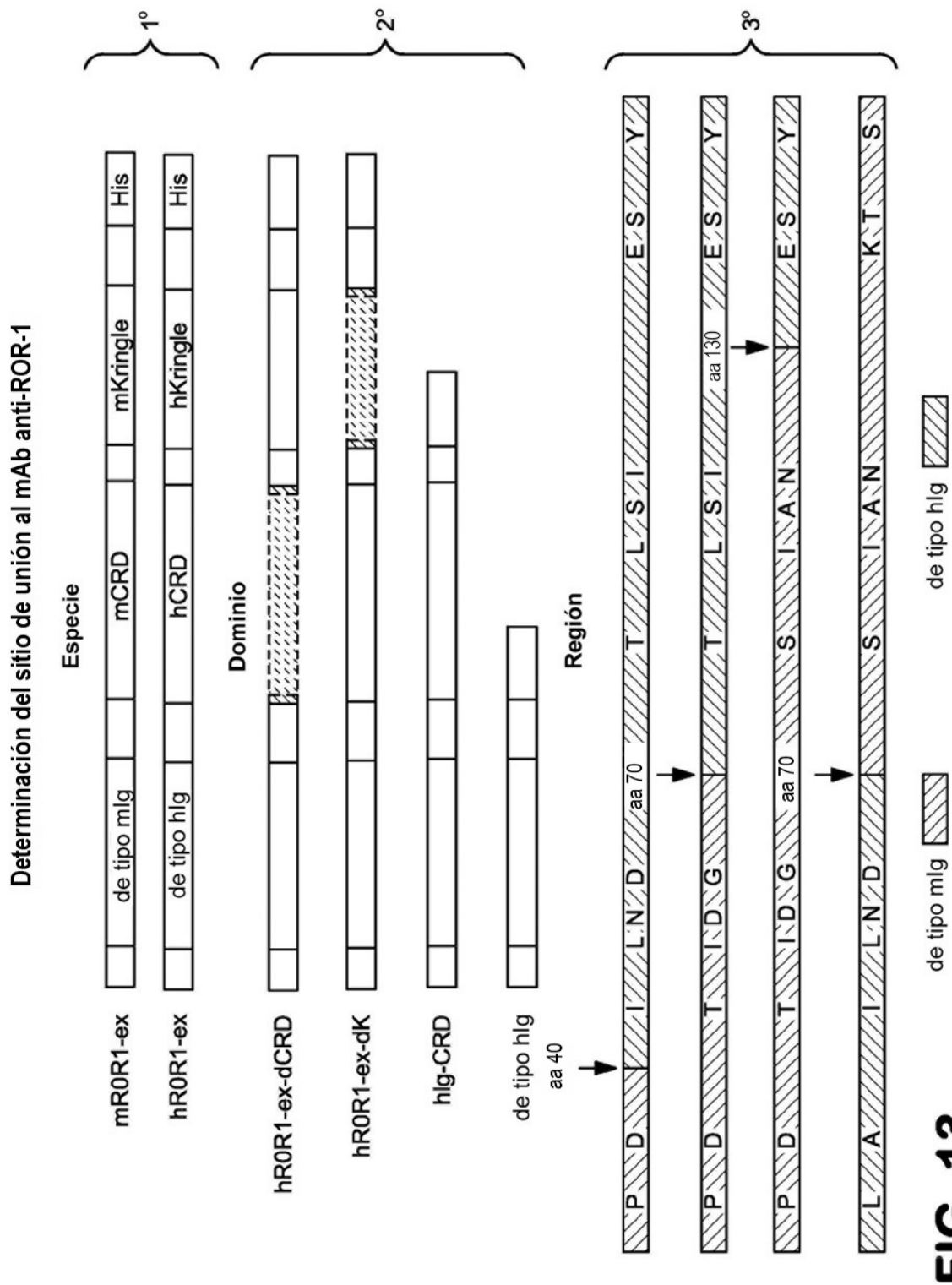


FIG. 13

Determinación de la región de unión del mAb anti-ROR-1

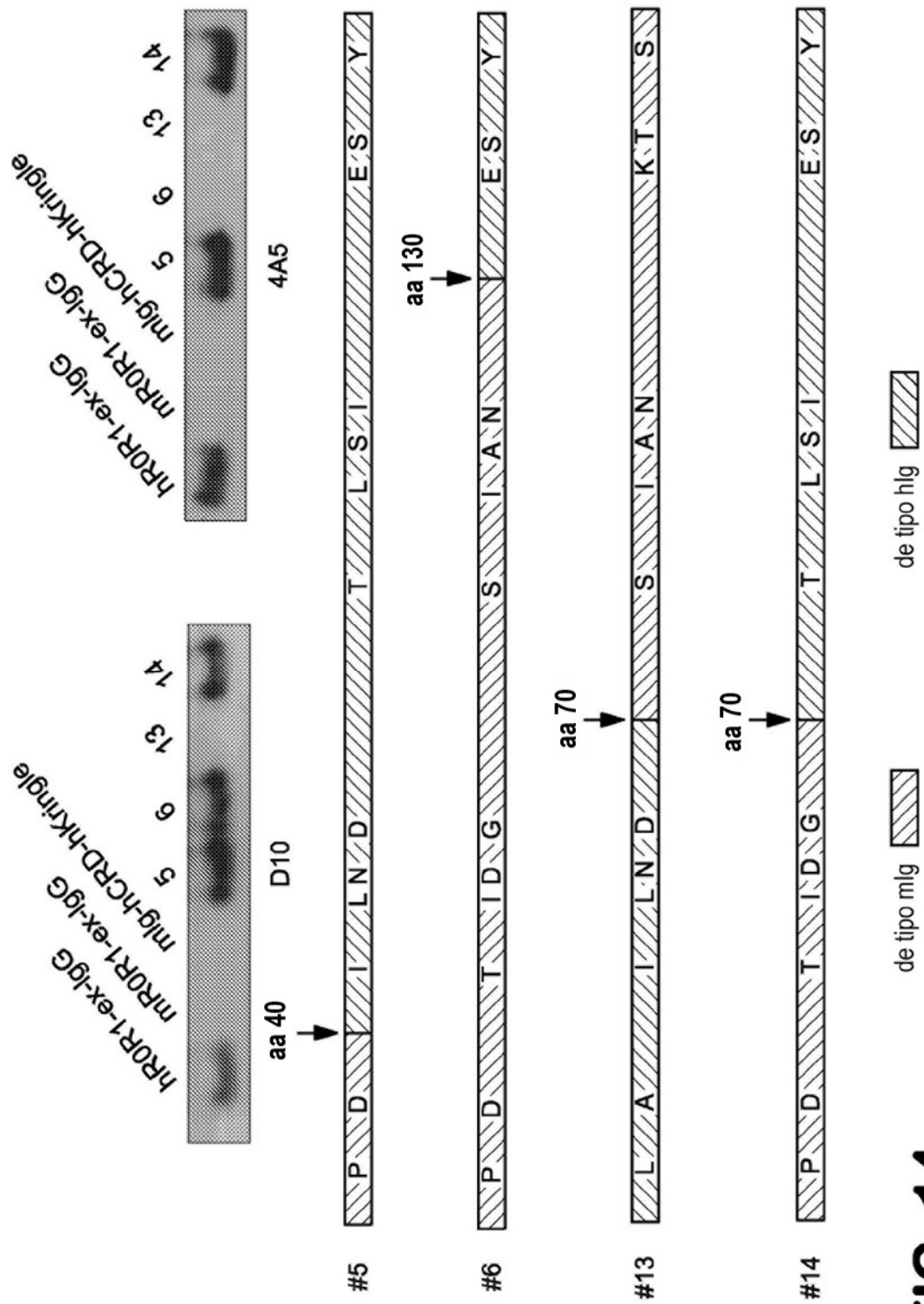
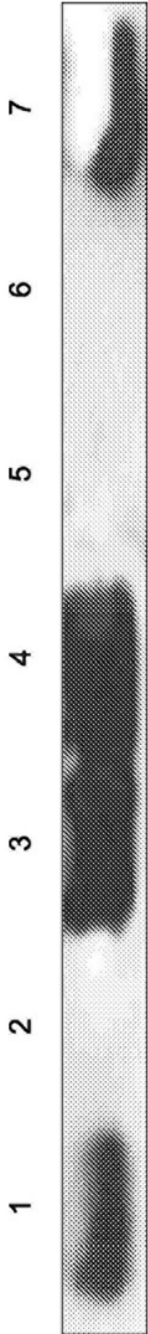


FIG. 14

3-D-10 se une al residuo de ácido glutámico humano

#6	P	D	T	I	D	G	S	I	A	N	E	S	Y
mR0R1	P	D	T	I	D	G	S	I	A	N	K	T	S

Los aminoácidos 138, 142 y 160 se mutaron individual y doblemente



1. Proteína nº 6 (tipo natural)

2. Mutación en 138

3. Mutación en 142

4. Mutación en 160
5. Mutación en 138-142

6. Mutación en 138-160

7. Mutación en 142-160

FIG. 15

Determinación de Kd de 3-D10

Análisis (X)

Línea base/Valores finales

5 a 10 (s) del inicio

10 a 5 (s) del final

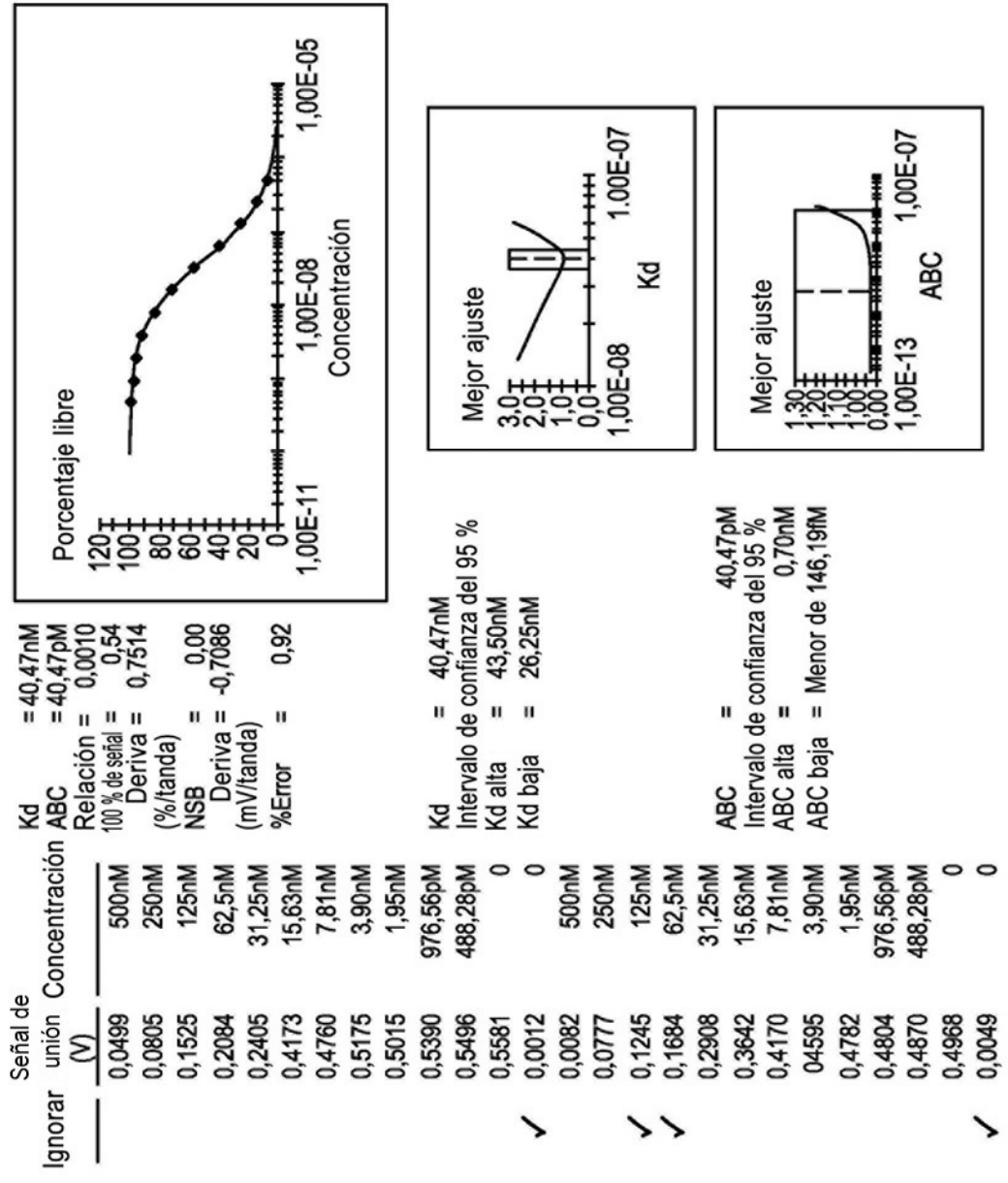


FIG. 16A

Determinación de Kd de 1-4A5

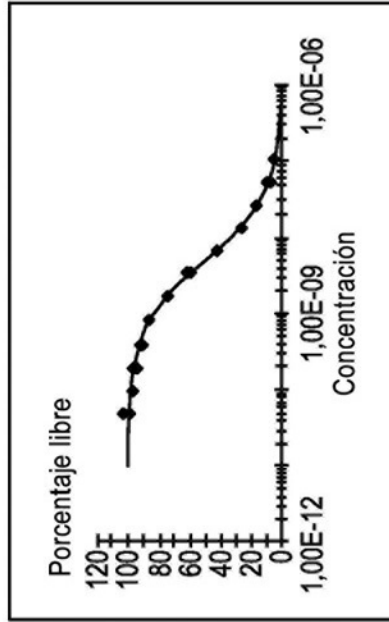
Análisis (x)

Línea base/Valores finales

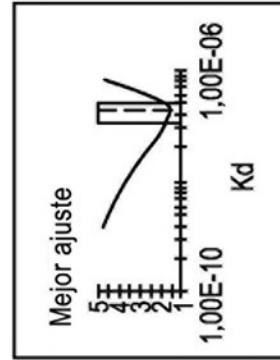
0 a 10 (s) del inicio

10 a 5 (s) del final

Señal de Ignorar unión	Concentración	Kd
0,0781	100nM	= 4,53nM
0,0990	50nM	= 62,92pM
0,1213	25nM	Relación = 0,0139
0,1554	12,5nM	100 % de señal = 0,40
0,2060	6,25nM	Deriva = -0,0110
0,2768	3,13nM	NSB = 0,04
0,3167	1,56nM	Deriva = -2,0021
0,3613	781,25pM	(mV/tanda)
0,3702	390,63pM	%Error = 1,53
0,3790	195,31pM	
0,3895	97,66pM	
0,4102	48,63pM	
0,3928	0	
0,0616	100nM	
0,0646	50nM	
0,0995	25nM	
0,1257	12,5nM	
0,1807	6,25nM	
0,2415	3,13nM	
0,2903	1,56nM	
0,3300	781,25pM	
0,3533	390,63pM	
0,3650	195,31pM	
0,3636	97,66pM	
0,3682	48,83pM	
0,3758	0	



Kd = 4,53nM
Intervalo de confianza del 95 %
Kd alta = 5,09nM
Kd baja = 3,33nM



ABC = 62,92pM
Intervalo de confianza del 95 %
ABC alta = 2,59nM
ABC baja = Menor de 227,30nM

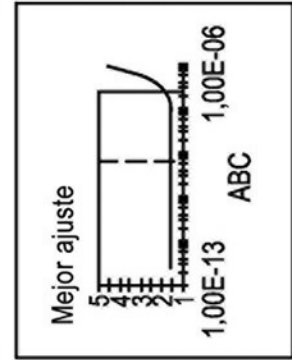
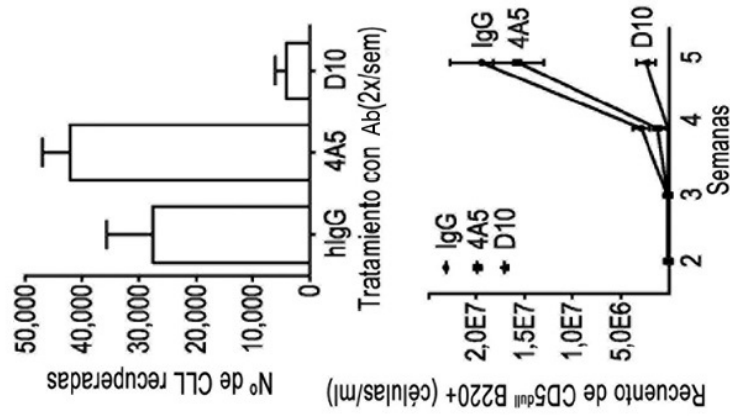


FIG. 16B

El mAb 3-D10 anti-ROR1 es altamente activo en ensayos *in vivo*

- mAb 3-D10 altamente activo en el modelo de actividad dependiente de nicho *in vivo*
 - Reducción sustancial de la carga leucémica usando 4 productos de pacientes con LLC primaria probados en 76 ratones
 - Actividad mucho mayor que otros mAb anti-ROR1 (4A5)
- mAb 3D-10 activo en el modelo de ratón inmunocompetente *in vivo*
 - Reducción sustancial en el modelo de leucemia que expresa ROR1 humana espontáneamente
 - Actividad mucho mayor que otros mAb anti-ROR1 (4A5)



El mAB 3-D10 tiene la máxima actividad anti-ROR1 en sistemas de ensayo *in vivo*

FIG. 17

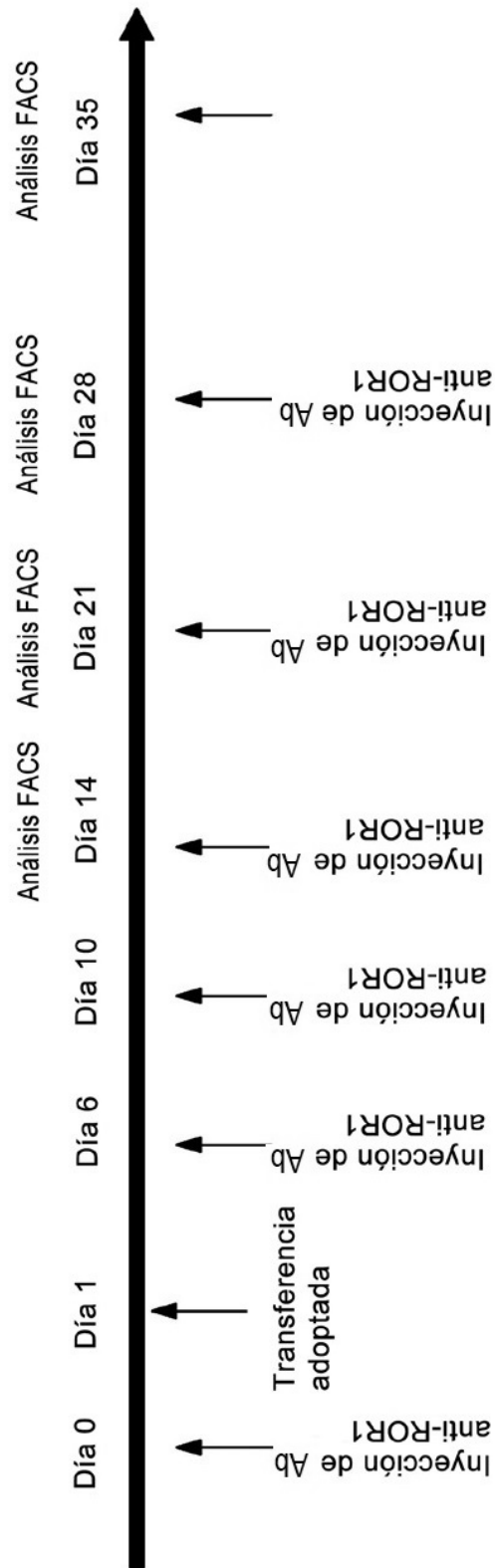


FIG. 18

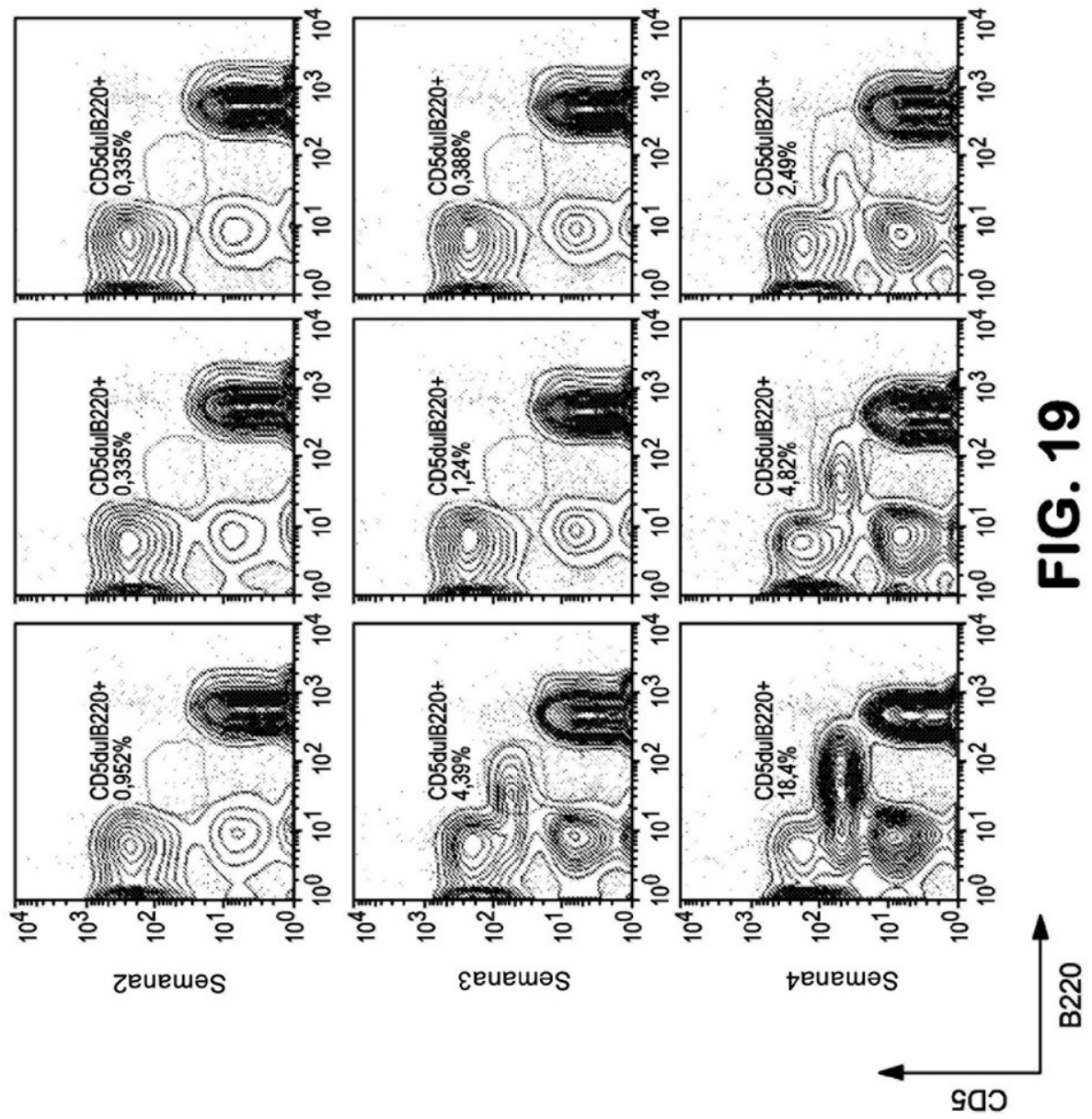


FIG. 19

Desarrollo de leucemia de CD5^{dull} B220⁺
(recuento absoluto de células de leucemia)

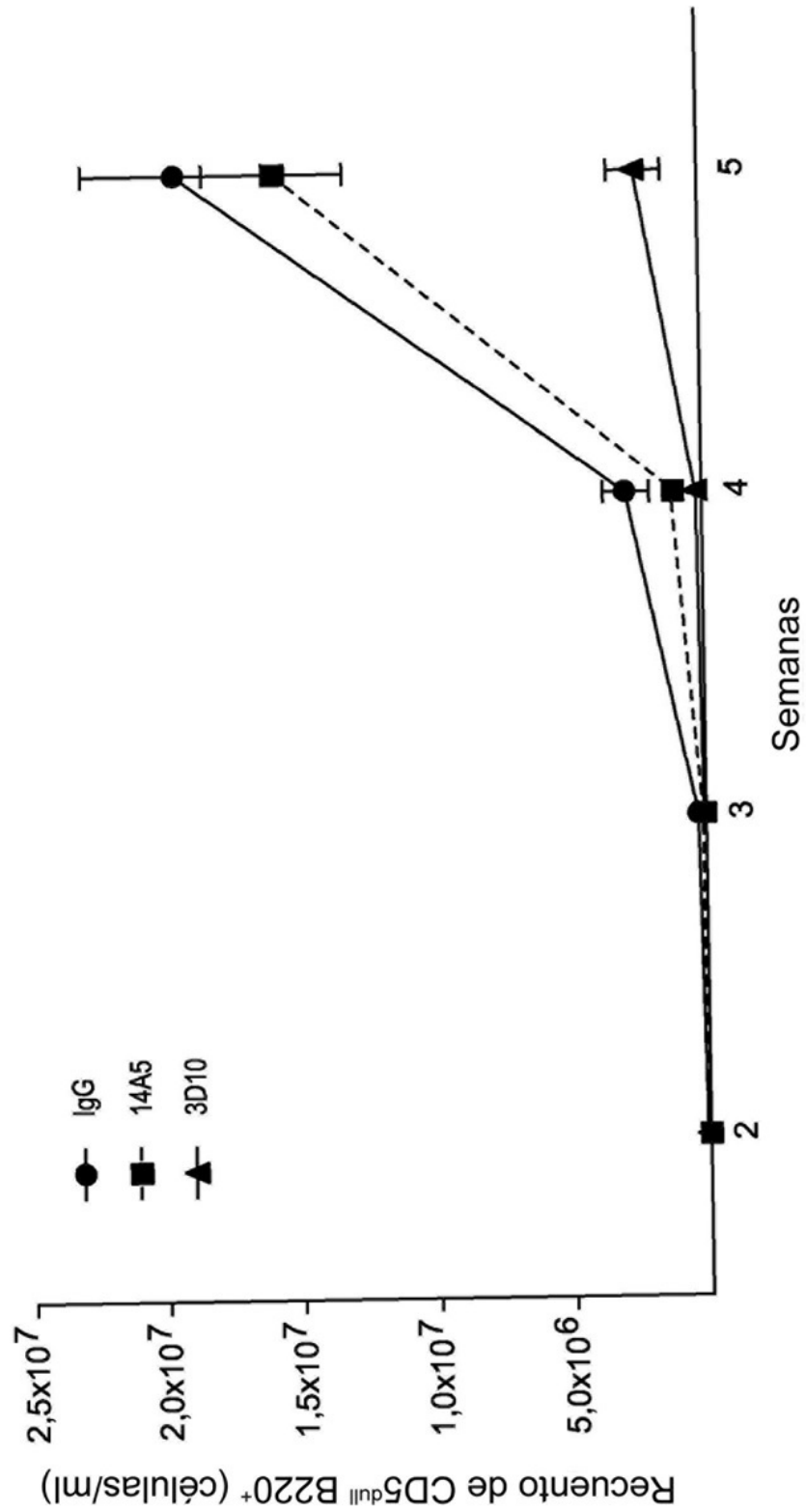


FIG. 20

Internalización rápida del Ab 3D-10 anti-ROR1 en células CLL

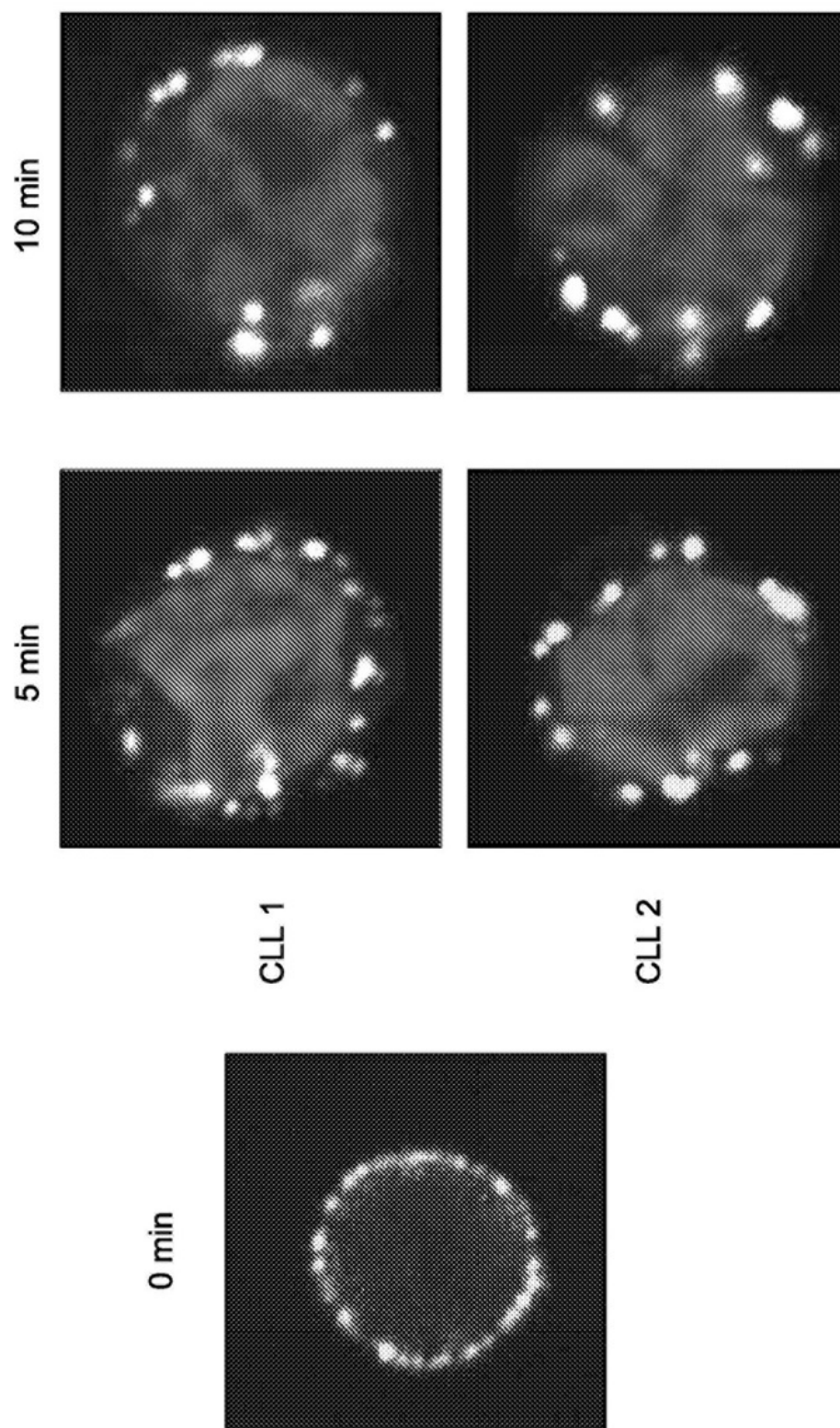


FIG. 21

Estudio de internalización de anticuerpos anti-hROR-1

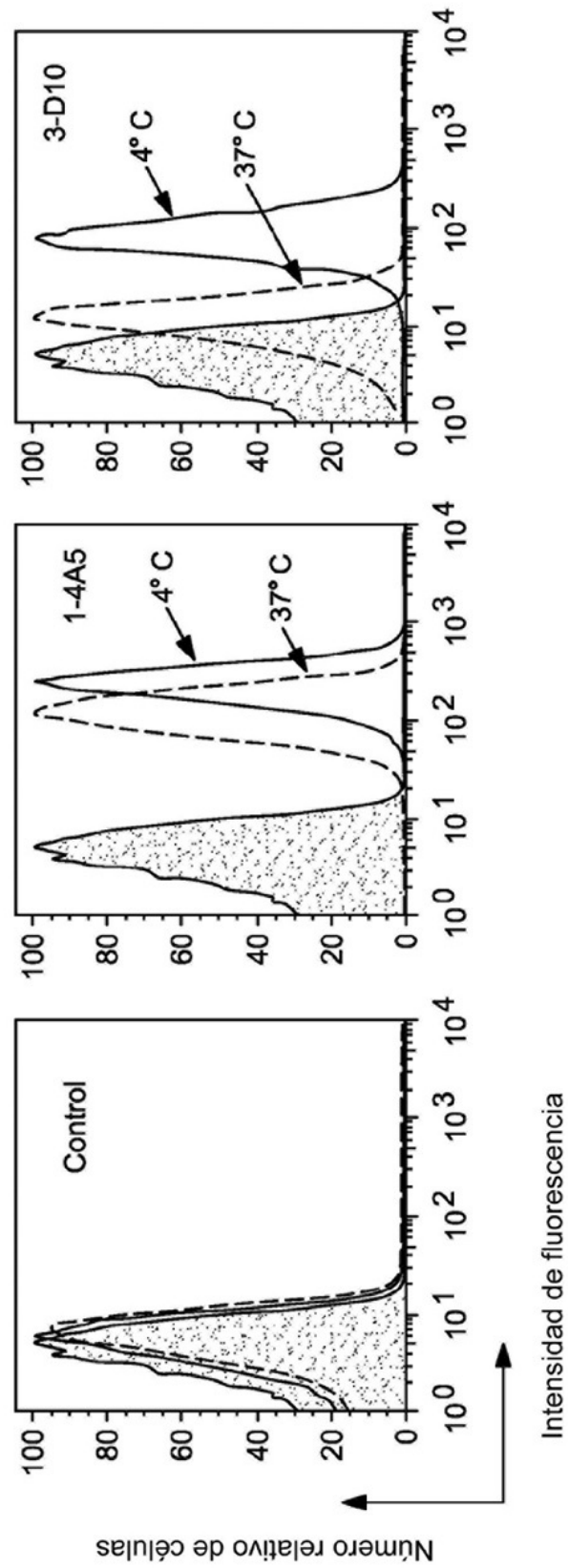


FIG. 22

Estudios de internalización de 1-4A5 y 3D-10 y cinética de la internalización de anticuerpo de ROR1

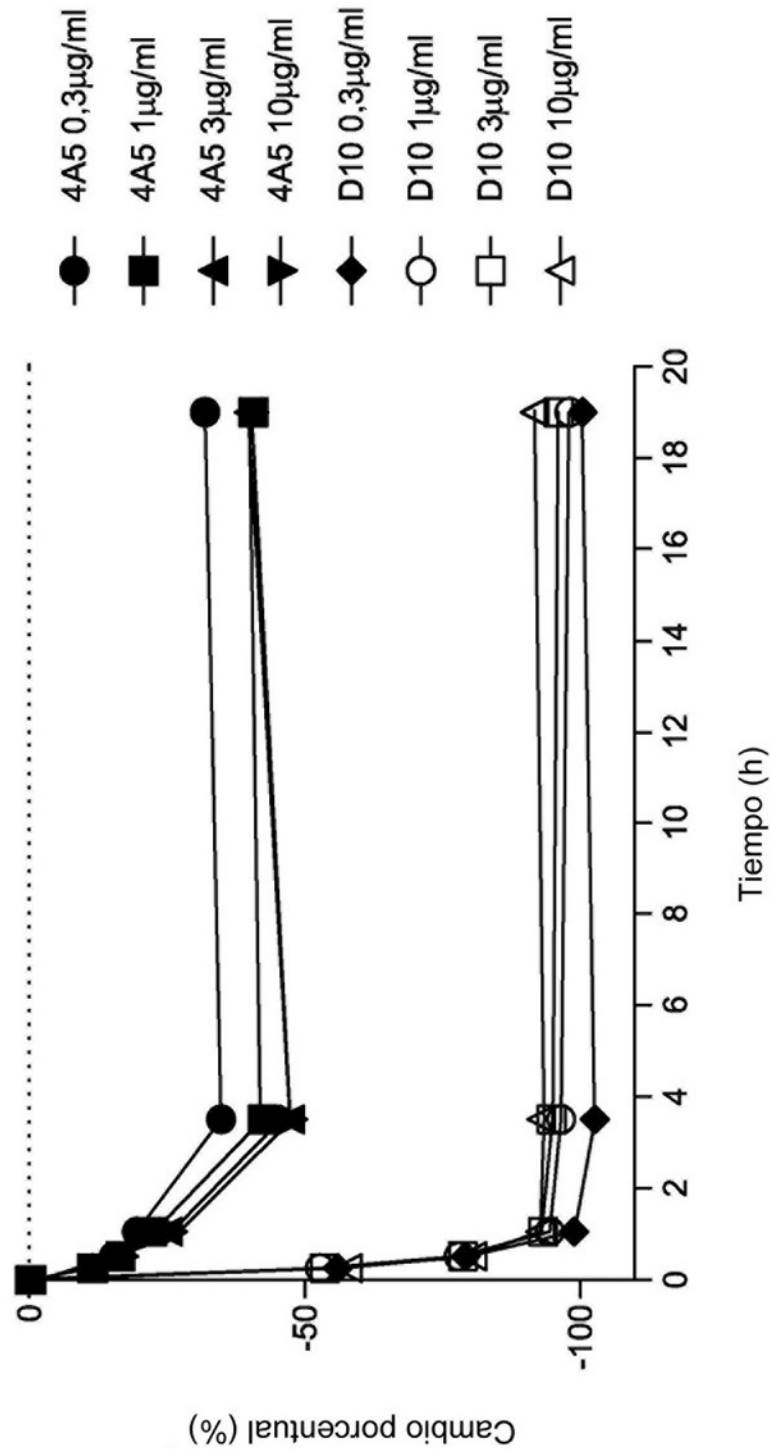
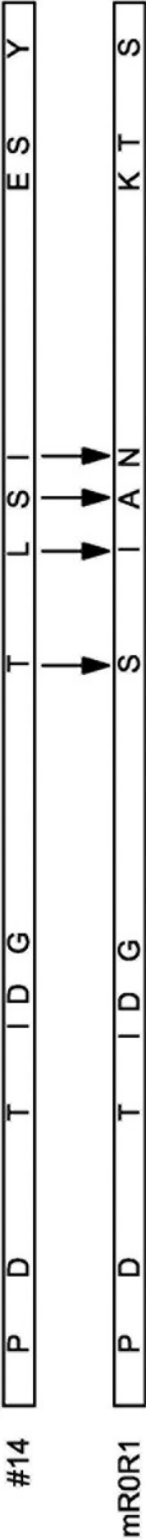
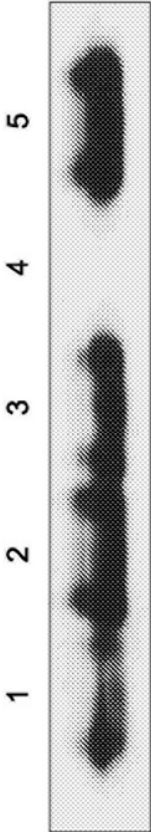


FIG. 23

Sitio de unión de 4A5



Los aminoácidos 88, 105, 109 y 111 se mutaron individualmente.



- 1. Mutación en aa 88
- 2. Mutación en aa 105
- 3. Mutación en aa 109
- 4. Mutación en aa 111
- 5. Proteína nº 14 (tipo natural)

4A5 se une al aminoácido 111 de ROR1 humana

FIG. 24