

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 361**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2018** **PCT/GB2018/051916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019** **WO19008379**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2018** **E 18742577 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.12.2021** **EP 3645565**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos para ROR1 y CD3**

30 Prioridad:

05.07.2017 GB 201710838

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

18.04.2022

73 Titular/es:

UCL BUSINESS LTD (100.0%)
University College London, Gower Street
London WC1E 6BT, GB

72 Inventor/es:

NATHWANI, AMIT;
GOHIL, SATYEN y
DELLA PERUTA, MARCO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 906 361 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos para ROR1 y CD3

- 5 La invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que se unen de manera selectiva al receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina cinasa (ROR1, por sus siglas en inglés) y a la subunidad CD3 del receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés).

Antecedentes de la invención

- 10 El receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina cinasa (ROR1) (también conocido como receptor tirosina cinasa neurotrófico relacionado con receptores 1, NTRKR1, por sus siglas en inglés) es un antígeno oncofetal expresado durante la embriogénesis, pero con expresión limitada en tejido adulto normal. Sin embargo, se expresa en una serie de neoplasias malignas hematológicas y sólidas: leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia de células del manto, tricoleucemia, cáncer de páncreas, 15 cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, glioblastoma, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer suprarrenal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, neuroblastoma, sarcoma, cáncer renal. Asimismo, ROR1 se expresa en un subconjunto de células madre cancerosas.
- 20 De este modo, ROR1 es una diana terapéutica atractiva. El documento EP2789630 describe anticuerpos biespecíficos contra CD3e y ROR1. Asimismo, sigue existiendo la necesidad de agentes que puedan usarse para tratar los cánceres anteriormente mencionados.

Sumario de la invención

- 25 La presente invención proporciona una molécula de anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva al receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina cinasa (ROR1); y un segundo dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva a la subunidad CD3 del receptor de linfocitos T (TCR); en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en donde:

- (a) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 9;
- 35 (b) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 10;
- (c) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 11;
- 40 (d) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 12;
- (e) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 13; o
- 45 (f) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 8 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 14.

- 50 Un primer aspecto de la divulgación se refiere a una molécula de anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva al receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina cinasa (ROR1), en donde el primer dominio de unión a antígeno se une a un epítipo de ROR1 que comprende el aminoácido Gln-261; y un segundo dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva a la subunidad CD3 del receptor de linfocitos T (TCR).

La presente invención también se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo de la invención en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable.

- 60 Asimismo, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo de la invención.

- Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tratando, de este modo, el cáncer. La presente invención también se refiere al anticuerpo o ácido nucleico para su uso en el tratamiento de cáncer. Asimismo, en el presente documento se describe el uso del anticuerpo o del
- 65

ácido nucleico en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

Los anticuerpos monoclonales divulgados se unen específicamente a un polipéptido de ROR1. En realizaciones adicionales, los anticuerpos monoclonales se unen específicamente a un polipéptido de ROR1 con una constante de equilibrio (K_D) de aproximadamente 6×10^{-9} M o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales se unen específicamente a un polipéptido de ROR1 con una K_D de aproximadamente $1,6 \times 10^{-9}$ M o menos, aproximadamente 2×10^{-9} M o menos, aproximadamente 3×10^{-9} M o menos, aproximadamente 4×10^{-9} M o menos o aproximadamente 5×10^{-9} M o menos.

Descripción detallada

Términos

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con su uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes sobre biología molecular en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). A menos que se explique de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación.

Administración: La introducción de una composición en un sujeto por una vía elegida. La administración puede ser local o sistémica. Por ejemplo, si la vía elegida es intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición en una vena del sujeto. En algunos ejemplos, se administra un anticuerpo divulgado a un sujeto.

Agente: Cualquier sustancia o cualquier combinación de sustancias que sea útil para conseguir un fin o resultado; por ejemplo, una sustancia o combinación de sustancias útiles para prevenir o tratar cáncer. Los agentes incluyen, y sin limitación, proteínas, moléculas de ácido nucleico, compuestos, moléculas pequeñas, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos u otras moléculas de interés. Un agente puede incluir un agente terapéutico (tal como un agente antivírico), un agente de diagnóstico o un agente farmacéutico. En algunas realizaciones, el agente es un agente polipeptídico (tal como un anticuerpo neutralizante). El experto en la materia comprenderá qué agentes particulares pueden ser útiles para conseguir más de un resultado.

Sustitución de aminoácidos: El reemplazo de un aminoácido en un péptido por un aminoácido diferente.

Amplificación: Una técnica que aumenta el número de copias de una molécula de ácido nucleico (tal como un ARN o un ADN). Un ejemplo de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa, en la que una muestra biológica se pone en contacto con un par de cebadores oligonucleotídicos, en condiciones que permitan la hibridación de los cebadores con una plantilla de ácido nucleico en la muestra. Los cebadores se prolongan en condiciones adecuadas, se disocian de la plantilla, y a continuación, se vuelven a hibridar, prolongar y disociar para amplificar el número de copias del ácido nucleico. El producto de amplificación puede caracterizarse mediante electroforesis, patrones de escisión por endonucleasas de restricción, hibridación o unión de oligonucleótidos y/o secuenciación de ácidos nucleicos usando técnicas convencionales. Otros ejemplos de amplificación incluyen la amplificación por desplazamiento de cadena, como se divulga en la patente de los Estados Unidos n.º 5.744.311; amplificación isotérmica sin transcripción, como se divulga en la patente de los Estados Unidos n.º 6.033.881; amplificación por reacción en cadena de reparación, como se divulga en la publicación del PCT n.º WO 90/01069; amplificación de la reacción en cadena de la ligasa, como se divulga en la publicación de patente europea EP-A-320.308; amplificación de la reacción en cadena de la ligasa por relleno de huecos, como se divulga en la patente de los Estados Unidos n.º 5.427.930; y amplificación sin transcripción de ARN NASBA™, como se divulga en la patente de los Estados Unidos n.º 6.025.134.

Animal: Organismos vivos multicelulares vertebrados, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye mamíferos humanos y no humanos. De forma análoga, el término "sujeto" incluye sujetos tanto sujetos humanos como veterinarios.

Anticuerpo: Un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente y reconoce un analito (antígeno) tal como un polipéptido de ROR1, o un fragmento inmunogénico del mismo. Los genes de inmunoglobulina incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los múltiples genes de regiones variables de inmunoglobulina.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas inalteradas, o en forma de numerosos fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. Por ejemplo, Fab, Fv, scFv que se unen específicamente a un polipéptido de ROR1, o fragmentos de este polipéptido, son agentes aglutinantes específicos. Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas mediante un enlazador, mientras que

en dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. La expresión también incluye formas modificadas genéticamente, tal como anticuerpos quiméricos y anticuerpos heteroconjugados, tal como anticuerpos biespecíficos. Véanse también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, Immunology, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, los siguientes: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo producida mediante digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera inalterada y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenido tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera inalterada y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo obtenido tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; (4) F(ab')₂, un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos por dos enlaces disulfuro; (5) Fv, un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y (6) anticuerpo monocatenario ("SCA", por sus siglas en inglés), una molécula genéticamente modificada que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado tal como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo se pueden producir mediante la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante. En algunos ejemplos, el término anticuerpo incluye las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR del anticuerpo injertado en un armazón.

Normalmente, una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Los anticuerpos divulgados se pueden cambiar de clase.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones también se conocen como "dominios"). En varias realizaciones, los dominios variables de cadena pesada y ligera se combinan para unirse específicamente al antígeno. En realizaciones adicionales, solo se requiere el dominio variable de cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada únicamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera (véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, Nature, 363:446-448, 1993; Sheriff *et al.*, Nat. Struct. Biol., 3:733-736, 1996). Los dominios variables de cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para colocar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son las principales responsables de la unión al antígeno. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para colocar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR de cada cadena normalmente se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 (desde el extremo N hasta el extremo C) y también se identifican normalmente por la cadena en la que se encuentra la CDR en particular. Por tanto, una CDR3 de V_H está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Las CDR de cadena ligera también se pueden denominar CDR L1, CDR L2 y CDR L3, o LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las CDR de cadena pesada pueden denominarse CDR H1, CDR H2 y CDR H3, o HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

Las referencias a "V_H" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluida la de un fragmento de anticuerpo, tal como Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a "V_L" o una "V_L" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, que incluye la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectedo los genes de la cadena ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, preparando células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo. Estas células fusionadas y su descendencia se denominan "hibridomas". En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos monoclonales humanizados. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos quiméricos. En algunos ejemplos, los anticuerpos monoclonales se aíslan de un sujeto. Pueden determinarse las secuencias de aminoácidos de dichos anticuerpos monoclonales aislados.

Un anticuerpo "humanizado" incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (tal como de chimpancé, de ratón, de rata o sintética). El anticuerpo no humano que proporciona las CDR se denomina "donante", y el anticuerpo humano que proporciona el marco conservado se denomina "aceptor". En una realización, todas las CDR son del anticuerpo donante en un anticuerpo humanizado. No es necesario que estén presentes las regiones constantes, pero si lo están, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de anticuerpos humanos, tal como al menos aproximadamente 85-90 %, tal como aproximadamente un 95 % o más idénticas. Por consiguiente, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de anticuerpos humanos naturales. Un "anticuerpo humanizado" puede incluir una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. El marco aceptor de un anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante. Los anticuerpos humanizados u otros monoclonales pueden tener sustituciones conservativas de aminoácidos adicionales que no tengan sustancialmente ningún efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones de las inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas humanizadas pueden construirse por medio de ingeniería genética (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.585.089). Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención son humanizados.

Un anticuerpo "quimérico" es un anticuerpo que incluye secuencias de dos anticuerpos diferentes, que normalmente son de especies diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender regiones variables de cadena pesada y ligera procedentes de una primera especie y regiones constantes de cadena pesada y ligera procedentes de una segunda especie. Las regiones variable y constante de la cadena ligera pueden proceder de una primera especie mientras que la región variable de la cadena pesada puede proceder de la primera especie y la región constante de la cadena pesada procede de una segunda especie.

Un "anticuerpo neutralizante" es un anticuerpo que reduce el efecto de un virus, bacteria o tumor, por ejemplo, al unirse a un antígeno específico en el virus, bacteria o tumor. En algunos ejemplos, un anticuerpo que es específico para un ROR1 neutraliza el efecto del tumor.

Antígeno: Un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo las composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluidos los inducidos por antígenos heterólogos, tales como los antígenos divulgados. "Epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a la región de un antígeno a la que responden los linfocitos B y/o T. En una realización, los linfocitos T responden al epítipo, cuando el epítipo se presenta junto con una molécula de MHC. Los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan frente a la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial exclusiva. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear.

Los ejemplos de antígenos incluyen, pero sin limitación, péptidos, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos que contienen determinantes antigénicos, tales como los reconocidos por una célula inmunitaria. Los antígenos pueden incluir péptidos obtenidos de un patógeno de interés o de una célula cancerosa. Los patógenos ilustrativos incluyen bacterias, hongos, virus y parásitos. En algunas realizaciones, un antígeno procede de una célula cancerosa, tal como una célula cancerosa hematológica (leucemia linfocítica crónica - CLL, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células del manto) o una neoplasia maligna sólida (mama, pancreática, melanoma). En algunas realizaciones, el antígeno es un polipéptido de ROR1 o un fragmento antigénico del mismo.

Un "epítipo diana" es un epítipo específico en un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo monoclonal. En algunos ejemplos, un epítipo diana incluye los restos de aminoácidos que entran en contacto con el anticuerpo de interés, de modo que el epítipo diana pueda seleccionarse mediante los restos de aminoácidos que se determine que están en contacto con el anticuerpo.

Afinidad de unión: Afinidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por un antígeno. En una realización, la afinidad se calcula mediante una modificación del método de Scatchard descrita por Frankel *et al.*, Mol. Immunol., 16:101-106, 1979. En otra realización, la afinidad de unión se mide mediante una tasa de disociación antígeno/anticuerpo. En otra realización más, una afinidad de unión alta se mide mediante un radioinmunoensayo competitivo. En varios ejemplos, una afinidad de unión alta es al menos aproximadamente 1×10^{-8} M. En otras realizaciones, una afinidad de unión alta es al menos aproximadamente $1,5 \times 10^{-8}$, al menos aproximadamente $2,0 \times 10^{-8}$, al menos aproximadamente $2,5 \times 10^{-8}$, al menos aproximadamente $3,0 \times 10^{-8}$, al menos aproximadamente $3,5 \times 10^{-8}$, al menos aproximadamente $4,0 \times 10^{-8}$, al menos aproximadamente $4,5 \times 10^{-8}$, al menos aproximadamente $5,0 \times 10^{-8}$ o al menos aproximadamente 1×10^{-9} M.

Conjugado: Un complejo de dos moléculas unidas entre sí, por ejemplo, unidas entre sí mediante un enlace covalente. En una realización, un anticuerpo se une a una molécula efectora; por ejemplo, un anticuerpo que se une

específicamente a un polipéptido de ROR1, unido covalentemente a una molécula efectora o a una toxina. La unión puede ser por medios químicos o recombinantes. En una realización, la unión es química, en donde una reacción entre el resto de anticuerpo y la molécula efectora ha producido un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula. Puede incluirse opcionalmente un enlazador peptídico (secuencia peptídica corta) entre el anticuerpo y la molécula efectora. Debido a que los conjugados pueden prepararse a partir de dos moléculas con funcionalidades diferentes, tales como un anticuerpo y una molécula efectora, en ocasiones también se les denomina "moléculas quiméricas". En una realización, un anticuerpo enlazado a una molécula efectora se une además a un lípido u otra molécula a una proteína o péptido para aumentar su semivida en el organismo.

Control: Un patrón de referencia. En algunas realizaciones, el control es una muestra obtenida de un paciente sano. En otras realizaciones, el control es una muestra de tejido obtenida de un paciente diagnosticado con cáncer que sirve como control positivo. En otras realizaciones más, el control es un control histórico o un valor de referencia patrón o un intervalo de valores (tal como una muestra de control sometida a ensayo anteriormente, tal como un grupo de pacientes infectados con pronóstico o resultado conocido, o un grupo de muestras que representan valores iniciales o valores normales).

Una diferencia entre una muestra de ensayo y un control puede ser un aumento o, por el contrario, una disminución. La diferencia puede ser una diferencia cualitativa o una diferencia cuantitativa, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa. En algunos ejemplos, una diferencia es un aumento o disminución, con respecto a un control, de al menos aproximadamente un 5 %, tal como al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 100 %, al menos aproximadamente un 150 %, al menos aproximadamente un 200 %, al menos aproximadamente un 250 %, al menos aproximadamente un 300 %, al menos aproximadamente un 350 %, al menos aproximadamente un 400 %, al menos aproximadamente un 500 % o más de un 500 %.

Marcador detectable: Una molécula detectable (también conocida como marcador) que se conjuga directa o indirectamente con una segunda molécula, tal como un anticuerpo, para facilitar la detección de la segunda molécula. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser susceptible de detección mediante ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imagen (tales como exploraciones por TC, RM, ultrasonidos, examen por fibra óptica y examen laparoscópico). Ejemplos no limitantes de marcadores detectables incluyen fluoróforos, proteínas fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radiactivos y metales o compuestos pesados (por ejemplo, nanocristales de óxido de hierro súper paramagnéticos para la detección mediante RMI). En un ejemplo, un "anticuerpo marcado" se refiere a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. Por ejemplo, el marcador es un marcador detectable, tal como la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación a un polipéptido de restos biotínico que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). Se conocen en la técnica y pueden utilizarse diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glucoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (tales como ³⁵S o ¹³¹I), marcadores fluorescentes (tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (tales como peroxidasa de rábano picante, betagalactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (tales como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo) o agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. En algunas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. Se analizan procedimientos para usar marcadores detectables y orientación en la elección de marcadores detectables apropiados para diversos fines, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1998). En realizaciones particulares de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo puede marcarse con un marcador detectable.

Detección: Identificar la existencia, presencia o hecho de algo. Los métodos generales de detección son conocidos por el experto en la materia (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 7.635.476) y puede complementarse con los protocolos y reactivos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se incluyen los métodos para detectar una célula que expresa un polipéptido de ROR1 en un sujeto.

Epítipo: Un determinante antigénico. Estos son grupos químicos o secuencias peptídicas particulares en una molécula que son antigénicos, es decir, que desencadenan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une específicamente a un epítipo antigénico particular en un polipéptido. En algunos ejemplos, un anticuerpo divulgado se une específicamente a un epítipo en la superficie de ROR1.

Región marco: Secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR. La expresión incluye regiones marco ligeras variables y pesadas variables. Las regiones marco sirven para mantener las CDR en una orientación adecuada para la unión al antígeno.

Polipéptido Fc: El polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el dominio de inmunoglobulina de la primera región constante. La región Fc generalmente se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM. Una región Fc también puede incluir parte o la totalidad de la bisagra aminoterminal flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, una región Fc puede comprender o no el fragmento de cola y puede o no estar unida por la cadena J. Para IgG, la región Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la parte inferior de la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cy2. Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana generalmente se define para que comprenda los restos C226 o P230 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU. Para IgA, la región Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Calpha2 y Calpha3 (Ca2 y Ca3) y la parte inferior de la bisagra entre Calpha1 (Ca1) y Ca2. Los análogos y variantes funcionalmente equivalentes de la región Fc están abarcados dentro de la definición de la región Fc. Un análogo funcionalmente equivalente de la región Fc puede ser una región Fc variante, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a la región Fc de tipo silvestre o natural. Las regiones Fc variantes tendrán al menos un 50 % de homología con una región Fc existente de forma natural, tal como aproximadamente un 80 % y aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % de homología. Los análogos funcionalmente equivalentes de la región Fc pueden comprender uno o más restos de aminoácidos añadidos o eliminados de los extremos N o C de la proteína, tal como no más de 30 o no más de 10 adiciones y/o eliminaciones. Los análogos funcionalmente equivalentes de la región Fc incluyen regiones Fc unidas operativamente a un compañero de fusión. Los análogos funcionalmente equivalentes de la región Fc deben comprender la mayoría de todos los dominios Ig que componen la región Fc como se define anteriormente; por ejemplo, las regiones Fc de IgG e IgA como se definen en el presente documento deben comprender la mayoría de la secuencia que codifica CH₂ y la mayoría de la secuencia que codifica CH₃. Por tanto, el dominio CH₂ por sí mismo, o el dominio CH₃ por sí mismo, no se consideran región Fc. La región Fc puede referirse a esta región aislada o a esta región en el contexto de un polipéptido de fusión Fc.

Células hospedadoras: Células en las que se puede propagar un vector y expresar su ADN, por ejemplo, un anticuerpo divulgado puede expresarse en una célula hospedadora. La célula puede ser procariota o eucariota. El término también incluye cualquier descendencia de la célula hospedadora sujeto. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica a la célula precursora puesto que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Sin embargo, dicha descendencia se incluye cuando se usa la expresión "célula hospedadora".

Inhibir o tratar una enfermedad: Inhibir la aparición completa de una enfermedad o afección, por ejemplo, en un sujeto que está en riesgo de padecer cáncer. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de haber comenzado a aparecer. El término "mejorar", con referencia a una enfermedad o afección patológica, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso se puede evidenciar, por ejemplo, por un inicio tardío de los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible, una reducción en la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, una progresión más lenta de la enfermedad, una reducción del tamaño del tumor/cáncer, una mejora en la salud general o el bienestar del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos de la enfermedad en particular. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o presenta solo signos tempranos a efectos de disminuir el riesgo de padecer una patología.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una célula, por ejemplo, un linfocito B, un ácido nucleico, péptido, proteína, dominio de cadena pesada o anticuerpo) se ha separado sustancialmente, se ha producido aparte de o se ha purificado de entre otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente aparece de forma natural, tal como, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos y proteínas. Los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas que se han "aislado" incluyen, por lo tanto, ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación convencionales. El término también abarca ácidos nucleicos, péptidos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente. En algunos ejemplos, un anticuerpo, tal como un anticuerpo específico para un polipéptido de ROR1 se puede aislar, por ejemplo, aislado de un sujeto con un tumor que expresa ROR1.

K_d: La constante de disociación para una interacción dada, tal como una interacción polipéptido-ligando o una interacción anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, para la interacción bimolecular de un anticuerpo (como cualquiera de los anticuerpos descritos aquí) y un antígeno (como un polipéptido de ROR1) es la concentración de los componentes individuales de la interacción bimolecular dividida por la concentración del complejo.

Marcador: Un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con otra molécula, tal como un anticuerpo o una proteína, para facilitar la detección de esa molécula. Los ejemplos específicos, no limitantes, de marcadores incluyen marcadores fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos. En algunos ejemplos, se marca un anticuerpo divulgado.

Ácido nucleico: Un polímero compuesto por unidades de nucleótidos (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos) unidos a través de enlaces fosfodiéster, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen

- no natural de los mismos. Por tanto, la expresión incluye polímeros de nucleótidos en los que los nucleótidos y las uniones entre ellos incluyen análogos sintéticos de origen no natural, tal como, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y similares. Dichos polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado. El término "oligonucleótido" se refiere normalmente a polinucleótidos cortos, generalmente no superiores a aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esta también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza a "T".
- En el presente documento se usa la notación convencional para describir secuencias de nucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de nucleótidos monocatenaria es el extremo 5'; la dirección izquierda de una secuencia de nucleótidos bicatenaria se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de nucleótidos a transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que un ARNm transcrito a partir de ese ADN y que se ubican en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias cadena arriba"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN codificante se denominan "secuencias cadena abajo".
- "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria.
- "Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de las mismas. Por tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm producido por ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y por lo general se proporciona en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción, de un gen o ADNc pueden denominarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique de otro modo, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.
- "Ácido nucleico recombinante" se refiere a un ácido nucleico que tiene secuencias de nucleótidos que no están unidas entre sí de forma natural. Esto incluye vectores de ácidos nucleicos que comprenden un ácido nucleico amplificado o ensamblado que puede usarse para transformar una célula hospedadora adecuada. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico recombinante se denomina "célula hospedadora recombinante". Después, el gen se expresa en la célula hospedadora recombinante para producir, por ejemplo, un "polipéptido recombinante". Un ácido nucleico recombinante también puede desempeñar una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión a ribosomas, etc.).
- Una primera secuencia es un "antisentido" con respecto a una segunda secuencia si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia híbrida de manera específica con un polinucleótido cuya secuencia es la segunda secuencia.
- Las expresiones utilizadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos incluyen "secuencia de referencia", "seleccionado entre", "ventana de comparación", "idéntica", "porcentaje de identidad de secuencia", "sustancialmente idéntica", "complementaria", y "sustancialmente complementaria".
- Para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se usan los parámetros del programa predeterminados. Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para la comparación. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds 1995 supplement)).
- Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360, 1987. El método utilizado es similar al método descrito por Higgins y Sharp,

CABIOS 5:151-153, 1989. Usando PILEUP, se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de prueba para determinar la relación de porcentaje de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: peso de hueco predeterminado (3,00), peso y longitud de hueco predeterminados (0,10) y huecos finales ponderados. PILEUP puede obtenerse del paquete informático de análisis de secuencias GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Devereaux *et al.*, Nuc. Acids Res. 12:387-395, 1984).

Otro ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990 y Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1977. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.gov). El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. El programa BLASTP (para secuencias de aminoácidos) usa como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 3 y una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989). Un oligonucleótido es una secuencia polinucleotídica lineal de una longitud de hasta aproximadamente 100 bases nucleotídicas.

ClustalW es un programa que alinea tres o más secuencias de manera computacionalmente eficaz. La alineación de múltiples secuencias resalta áreas de similitud que pueden estar asociadas con características específicas que se han conservado más que otras regiones. Por tanto, este programa puede clasificar secuencias para análisis filogenético, que tiene como objetivo modelar las sustituciones que se han producido a lo largo de la evolución y derivar las relaciones evolutivas entre secuencias. El formulario web de alineación de secuencias múltiples de ClustalW está disponible en internet en EMBL-EBI (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), véase también Larkin *et al.*, Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948.

Un polinucleótido o secuencia de un ácido nucleico se refiere a una forma polimérica de nucleótido de al menos 10 bases de longitud. Un polinucleótido recombinante incluye un polinucleótido que no está inmediatamente contiguo a las dos secuencias codificantes a las que está inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que procede. Por tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma; o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquiera de los nucleótidos. La expresión incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

Transportadores farmacéuticamente aceptables: Los transportadores farmacéuticamente aceptables de uso son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 19ª edición, 1995, describe composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de los anticuerpos divulgados en el presente documento.

En general, la naturaleza del transportador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéuticos y fisiológicamente aceptables, que incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas en polvo, píldora, comprimido o cápsula), los transportadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de transportadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que han de administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias adyuvantes no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.

Agente farmacéutico: Un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto o una célula. En algunos ejemplos, un agente farmacéutico incluye uno o más de los anticuerpos divulgados.

Polipéptido: Cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o la modificación postraduccional (por ejemplo, glucosilación o fosforilación). En una realización, el polipéptido es un polipéptido de ROR1. En una realización, el polipéptido es un anticuerpo divulgado o un fragmento del mismo. Un "resto" se refiere a un aminoácido o mimético de aminoácido incorporado en un polipéptido por un enlace amida o un mimético de enlace amida. Un polipéptido tiene un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxiterminal. Las tablas de sustituciones de aminoácidos conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas por un experto habitual en la materia. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);

- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, se concibe como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de péptido purificada es una en la que el péptido o la proteína (tal como un anticuerpo) está más enriquecido que el péptido o la proteína en su entorno natural dentro de una célula. En una realización, una preparación se purifica de manera que la proteína o péptido represente al menos el 50 % del contenido total de péptido o proteína de la preparación.

Recombinante: Un ácido nucleico recombinante es uno que tiene una secuencia que no es de origen natural o tiene una secuencia que se realiza mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otra forma están separados. Esta combinación artificial con frecuencia se logra mediante síntesis química o, más habitualmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

Identidad de secuencia: La similitud entre secuencias de aminoácidos se expresa en términos de la similitud entre las secuencias, también denominada identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide con frecuencia en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes de un polipéptido poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencia cuando se alineen usando métodos convencionales.

Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para comparación. Se pueden usar varios programas y algoritmos de alineación como se describe anteriormente. Altschul *et al.*, Nature Genet. 6:119, 1994, presenta una consideración detallada de métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología. La herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés) del NCBI (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403, 1990) está disponible en varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en internet (junto con una descripción de cómo determinar la identidad de la secuencia usando este programa).

Los homólogos y variantes de un V_L o un V_H de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido se caracterizan normalmente por la posesión de al menos aproximadamente un 75 %, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, contada sobre la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de interés. Las proteínas con una similitud aún mayor con las secuencias de referencia mostrarán identidades crecientes en porcentaje cuando se evalúen mediante este método, tal como al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia. Cuando se compara menos de la secuencia completa para determinar la identidad de secuencia, los homólogos y variantes normalmente poseerán una identidad de secuencia de al menos un 80 % sobre ventanas cortas de 10-20 aminoácidos y pueden poseer identidades de secuencia de al menos un 85 % o al menos un 90 % o un 95 % dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Un experto en la materia apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan solamente como guía; es muy posible que puedan obtenerse homólogos muy significativos que se encuentren fuera de los intervalos proporcionados.

Los ácidos nucleicos que se "hibridan de manera selectiva" o "se unen de manera selectiva" lo hacen en condiciones de rigurosidad moderada o alta que excluyen secuencias de nucleótidos no relacionadas. En las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones utilizadas para lograr un nivel particular de rigurosidad variarán, dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se hibridan. Por ejemplo, la longitud, grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido de GC frente a AT) y el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN frente a ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos se pueden considerar al seleccionar las condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.

Un ejemplo específico de condiciones de rigurosidad progresivamente más altas es el siguiente: 2 x SSC/SDS al 0,1 % aproximadamente a temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0,2 x SSC/SDS al 0,1 % aproximadamente a temperatura ambiente (condiciones de baja rigurosidad); 0,2 x SSC/SDS al 0,1 % a unos 42 °C (condiciones de rigurosidad moderada); y 0,1 x SSC a aproximadamente 68 °C (condiciones de alta rigurosidad). Un experto en la materia puede determinar fácilmente las variaciones de estas condiciones (por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). El lavado se puede realizar usando únicamente una de estas condiciones, por ejemplo, condiciones de alta rigurosidad, o se puede usar cada una de las condiciones, por ejemplo, durante 10-15 minutos cada una, en el orden enumerado a continuación, repitiendo cualquiera o todas las etapas enumeradas. Sin embargo, tal como se menciona anteriormente, las condiciones óptimas variarán, dependiendo de la reacción de hibridación particular implicada, y pueden determinarse empíricamente.

Unión específica: Cuando se refiere a un anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de una proteína, péptido o polisacárido diana en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros

productos biológicos. Por tanto, en condiciones designadas, un anticuerpo se une preferentemente a una proteína, péptido o polisacárido (tal como un antígeno presente en la superficie de un tumor, por ejemplo, ROR1) diana particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas o polisacáridos presentes en la muestra o sujeto. La unión específica puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica. Con referencia a un complejo anticuerpo-antígeno, la unión específica del antígeno y el anticuerpo tiene una K_d de menos de aproximadamente 10^{-7} molar, tal como menos de aproximadamente 10^{-7} molar, 10^{-8} molar, 10^{-9} o incluso menos de aproximadamente 10^{-10} molar.

Agente terapéutico: Utilizado en un sentido genérico, incluye agentes de tratamiento, agentes profilácticos y agentes de reemplazo.

Cantidad terapéuticamente eficaz o cantidad eficaz: Una cantidad de una sustancia específica, tal como un anticuerpo divulgado, suficiente para conseguir un efecto deseado en un sujeto que se esté tratando. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad necesaria para inhibir el crecimiento tumoral. En varias realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad necesaria para reducir un síntoma de la enfermedad. Cuando se administra a un sujeto, generalmente se usará una dosis que consiga las concentraciones tisulares objetivo que se ha demostrado que consiguen un efecto *in vitro* deseado.

Vector: Una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula hospedadora mediante un vector, produciendo de este modo una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

Los términos en singular "un", "uno/una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De forma análoga, se pretende que la palabra "o" incluya "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento a la hora de poner en práctica o probar la presente divulgación, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a ROR1 y CD3

En el presente documento se divulgan anticuerpos clínicamente útiles que se unen específicamente a ROR1 y CD3. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido de ROR1 con una constante de equilibrio (K_D) de aproximadamente 6×10^{-9} M o menos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido de ROR1 con una K_D de aproximadamente $1,6 \times 10^{-9}$ M o menos, aproximadamente 2×10^{-9} M o menos, aproximadamente 3×10^{-9} M o menos, aproximadamente 4×10^{-9} M o menos o aproximadamente 5×10^{-9} M o menos.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo IgM o IgG, tal como IgG₁ o una IgG₂. La clase de un anticuerpo que se une específicamente a ROR1 puede cambiarse por otra. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se aísla usando métodos bien conocidos en la técnica, de manera que no incluya ninguna secuencia de ácido nucleico que codifique la región constante de la cadena ligera o pesada, respectivamente. La molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H entonces se une operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una C_L o C_H de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto puede conseguirse usando un vector o una molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H , como se conoce en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a ROR1 que originalmente era IgM puede cambiarse de clase a IgG. Puede usarse el cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, tal como de IgG₁ a IgG₂.

El anticuerpo divulgado en el presente documento puede ser un anticuerpo de rata y puede incluir una región marco de rata. En algunas realizaciones preferidas, el anticuerpo está humanizado y, por lo tanto, incluye una o más regiones marco humanas. En algunas realizaciones, el anticuerpo divulgado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye regiones de rata y humanas.

El anticuerpo puede unirse específicamente a un polipéptido de ROR1. Preferentemente, el anticuerpo puede unirse específicamente a un polipéptido de ROR1 humano. El anticuerpo preferentemente comprende una cadena pesada y una cadena ligera y preferentemente cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FWR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3, FWR4 como se describe anteriormente.

En un primer aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva al receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina cinasa (ROR1) comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende una región determinante de la

- complementariedad de cadena ligera (LCDR)1, una LCDR2 y una LCDR3, en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16; LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18; y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20; y en donde el dominio variable de cadena pesada comprende una región determinante de la complementariedad de cadena pesada (HCDR)1, una HCDR2 y una HCDR3, en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23; HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25; y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 57; en donde la secuencia de cada región determinante de la complementariedad puede diferir de la secuencia dada hasta en dos posiciones de aminoácidos.
- 10 El anticuerpo se une específicamente a un polipéptido de ROR1 y se une específicamente a CD3. El primer y/o segundo dominio de unión a antígeno puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En realizaciones particulares, tanto el primero como el segundo dominio de unión a antígeno son un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 15 Como se indica anteriormente, la secuencia de cada CDR puede diferir de la secuencia dada hasta en dos posiciones de aminoácidos. Esto significa que la CDR puede contener una o dos sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia dada. Sin embargo, si una o más de las CDR contienen sustituciones de aminoácidos, el anticuerpo aún puede unirse de manera selectiva a ROR1. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas.
- 20 Preferentemente, la secuencia de cada CDR puede diferir de la secuencia dada en una posición de aminoácido. Esto significa que la CDR puede contener una sustitución de aminoácido en comparación con la secuencia dada. Preferentemente, la sustitución de aminoácido es una sustitución conservativa.
- 25 En algunos aspectos, la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HCDR3) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 27, 36, 44 y 49. Preferentemente, HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 36, 44 y 49.
- 30 El primer dominio de unión a antígeno puede tener un dominio variable de cadena ligera que comprende una región marco de cadena ligera (LCFR)1 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 15, 29, 50 y 53; una LCFR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 17, 30, 38 y 46; una LCFR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 19, 31, 39, 47 y 54; y una LCFR4 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las
- 35 SEQ ID NO: 21, 32 y 40.
- Preferentemente, el primer dominio de unión a antígeno tiene un dominio variable de cadena ligera que comprende una LCFR1 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 29, 50 y 53; una LCFR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 30, 38 y 46; una
- 40 LCFR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 31, 39, 47 y 54; y una LCFR4 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 32 y 40.
- El primer dominio de unión a antígeno puede tener un dominio variable de cadena pesada que comprende una región marco de cadena pesada (HCFR)1 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ
- 45 ID NO: 22, 33, 41 y 55; una HCFR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 24, 34, 42 y 51; una HCFR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 26, 35, 43, 48, 52 y 56; y una HCFR4 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 28, 37 y 45.
- 50 Preferentemente, el primer dominio de unión a antígeno puede tener un dominio variable de cadena pesada que comprende una HCFR1 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 33, 41 y 55; una HCFR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 34, 42 y 51; una HCFR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 35, 43, 48, 52 y 56; y una HCFR4 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO:
- 55 37 y 45.
- Tal como se indica a continuación, la secuencia de cada región marco mencionada anteriormente puede diferir de la secuencia dada. Por ejemplo, puede diferir hasta en 10 posiciones de aminoácidos, aunque se prefiere que estén presentes menos de 10 sustituciones de aminoácidos de modo que pueda haber hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1
- 60 sustituciones de aminoácidos.
- Como alternativa, cada región marco puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las secuencias de aminoácidos expuestas en el listado de secuencias.
- 65 Preferentemente, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en

una de las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Más preferentemente, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8.

Preferentemente, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 y 14. Más preferentemente, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14.

Las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8 son regiones variables de cadena ligera humanizadas. Las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14 son regiones variables de cadena ligera humanizadas. Los inventores probaron todas las combinaciones de estas regiones de cadena ligera y pesada dando como resultado 25 construcciones diferentes.

Por lo tanto, en algunos aspectos, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14. En un aspecto particular, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 10, 12 y 13.

En otros aspectos, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14.

En aspectos adicionales, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14.

En aspectos alternativos, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14.

En diversos aspectos, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 8 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14.

De forma análoga, en algunos aspectos, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 10 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8.

En otros aspectos, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 11 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8.

En aspectos adicionales, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 12 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8.

En aspectos alternativos, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 13 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8.

En diversos aspectos, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 14 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8.

Para el primer dominio de unión a antígeno,

(a) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 9;

(b) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 10;

(c) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 11;

(d) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la

SEQ ID NO: 12;

(e) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 13; o

5 (f) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 8 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 14.

10 Tal como se indica a continuación, la secuencia de cada dominio variable de cadena ligera y dominio variable de cadena pesada mencionados anteriormente puede diferir de la secuencia dada. Por ejemplo, el dominio variable de cadena ligera/pesada puede comprender una secuencia que es, al menos, un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las secuencias de aminoácidos expuestas en el listado de secuencias. Como alternativa, la secuencia del dominio variable de cadena ligera/pesada puede diferir hasta en 10 posiciones de aminoácidos, aunque se prefiere que estén presentes menos de 10 sustituciones de aminoácidos de modo que pueda haber hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos.

20 Como se menciona anteriormente, en algunos aspectos, las regiones marco de cadena ligera, las regiones marco de cadena pesada, los dominios variables de cadena ligera y los dominios variables de cadena pesada comprenden una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las secuencias de aminoácidos expuestas anteriormente. Por ejemplo, las regiones marco de cadena ligera, las regiones marco de cadena pesada, los dominios variables de cadena ligera y los dominios variables de cadena pesada pueden incluir como máximo 10, como máximo 9, como máximo 8, como máximo 7, como máximo 6, como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3, como máximo dos o como máximo una sustituciones de un aminoácido en las secuencias de aminoácidos como se establece anteriormente. Cuando hay variación en las secuencias del dominio variable de

25 cadena ligera y del dominio variable de cadena pesada, cualquier sustitución de aminoácidos preferentemente no está en las CDR. En particular, las regiones marco de cadena ligera y/o las regiones marco de cadena pesada de los anticuerpos descritos anteriormente pueden comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las secuencias de aminoácidos expuestas anteriormente. Asimismo, las regiones marco de cadena ligera y/o las regiones marco de cadena pesada pueden incluir como máximo

30 10, como máximo 9, como máximo 8, como máximo 7, como máximo 6, como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3, como máximo dos o como máximo una sustituciones de un aminoácido en las secuencias de aminoácidos como se establece anteriormente. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas como se describe anteriormente. Por ejemplo, las regiones marco pueden comprender tales sustituciones para humanizar la secuencia. Preferentemente, las regiones marco están humanizadas.

35 En un segundo aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva al receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina cinasa (ROR1) comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3, en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 58; LCDR2 comprende la

40 secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 59; y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20; y en donde el dominio variable de cadena pesada comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3, en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60; HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61; y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 62; en donde la secuencia de cada región determinante de la

45 complementariedad puede diferir de la secuencia dada hasta en dos posiciones de aminoácidos.

50 Como se indica anteriormente, la secuencia de cada CDR puede diferir de la secuencia dada hasta en dos posiciones de aminoácidos. Esto significa que la CDR puede contener una o dos sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia dada. Sin embargo, si una o más de las CDR contienen sustituciones de aminoácidos, el anticuerpo aún puede unirse de manera selectiva a ROR1. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas.

55 Preferentemente, la secuencia de cada CDR puede diferir de la secuencia dada en una posición de aminoácido. Esto significa que la CDR puede contener una sustitución de aminoácido en comparación con la secuencia dada. Preferentemente, la sustitución de aminoácido es una sustitución conservativa. Más preferentemente, la secuencia de cada CDR no difiere de la secuencia dada.

60 El anticuerpo se une específicamente a un polipéptido de ROR1 y se une específicamente a CD3. El primer y/o segundo dominio de unión a antígeno puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En realizaciones particulares, tanto el primero como el segundo dominio de unión a antígeno son un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

65 Preferentemente, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Más preferentemente, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8.

Preferentemente, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 y 14. Más preferentemente, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14.

Como se ha dicho anteriormente en relación con el primer aspecto, los presentes inventores probaron todas las combinaciones de los dominios variables de cadena ligera (SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 y 8) y de los dominios variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 y 14) dando como resultado 25 construcciones diferentes. Por lo tanto, la descripción anterior con respecto a las combinaciones de estas secuencias también es aplicable al segundo aspecto mencionado anteriormente.

Para el primer dominio de unión a antígeno,

(a) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 9;

(b) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 10;

(c) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 11;

(d) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 12;

(e) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 13; o

(f) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 8 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 14.

La secuencia de cada dominio variable de cadena ligera y dominio variable de cadena pesada mencionados anteriormente puede diferir de la secuencia dada. Por ejemplo, el dominio variable de cadena ligera/pesada puede comprender una secuencia que es, al menos, un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las secuencias de aminoácidos expuestas en el listado de secuencias. Como alternativa, la secuencia del dominio variable de cadena ligera/pesada puede diferir hasta en 10 posiciones de aminoácidos, aunque se prefiere que estén presentes menos de 10 sustituciones de aminoácidos de modo que pueda haber hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos.

A partir de todos los aspectos descritos anteriormente, un experto en la materia sabrá que cualquier sustitución conservará los restos de aminoácidos críticos necesarios para el correcto plegamiento y la estabilización entre las regiones V_H y las V_L y conservará las características de carga de los restos para conservar el pI bajo y la toxicidad baja de los anticuerpos. Por tanto, un experto en la materia puede revisar fácilmente las secuencias mostradas anteriormente, identificar una sustitución conservativa y producir la variante conservativa utilizando técnicas moleculares bien conocidas.

Se ha realizado el mapeo de epítomos para los dominios de unión a antígeno analizados anteriormente. Se ha observado que el resto Gln-261 de ROR1 humano es esencial para el dominio de unión a antígeno. Por lo tanto, también se proporciona un dominio de unión a antígeno que se une a un epítipo de ROR1, en donde el epítipo comprende el aminoácido Gln-261.

El segundo dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva a la subunidad CD3 del receptor de linfocitos T (TCR) puede ser cualquier dominio de unión a antígeno adecuado y dichos dominios de unión son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales contra CD3 se pueden obtener de ThermoFisher Scientific. Asimismo, también se conocen en la técnica anticuerpos biespecíficos que se unen a un antígeno tumoral y CD3, por ejemplo, como se describe en Baeuerle y Reinhardt (Cancer Res (2009); 69(12): 4941-4944), Chames y Baty (MAbs. (2009); 1(6): 539-547) y Hoffmann *et al.* (Int. J. Cancer (2005) 115, 98-104).

El segundo dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva a la subunidad CD3 del receptor de linfocitos T (TCR) puede comprender un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67 y 68, y en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos establecida como una de las SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73 y 74. Preferentemente, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 64, 65, 66, 67 y 68, y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73 y 74.

En realizaciones particulares del segundo dominio de unión a antígeno,

- (a) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 63 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 69;
- (b) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 64 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 70;
- (c) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 65 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 71;
- (d) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 66 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 72;
- (e) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 67 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 73; o
- (f) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 68 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 74.

La secuencia de cada dominio variable de cadena ligera y dominio variable de cadena pesada del segundo dominio de unión a antígeno mencionados anteriormente puede diferir de la secuencia dada. Por ejemplo, el dominio variable de cadena ligera/pesada puede comprender una secuencia que es, al menos, un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las secuencias de aminoácidos expuestas en el listado de secuencias. Como alternativa, la secuencia del dominio variable de cadena ligera/pesada puede diferir hasta en 10 posiciones de aminoácidos, aunque se prefiere que estén presentes menos de 10 sustituciones de aminoácidos de modo que pueda haber hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, no hay sustituciones presentes en las CDR de la cadena pesada/ligera.

El primer dominio de unión a antígeno puede tener la estructura de un fragmento de anticuerpo tal como Fab, F(ab')₂, y Fv que incluyen una región variable de cadena pesada y cadena ligera y son capaces de unirse al determinante epitópico en ROR1. De forma análoga, el segundo dominio de unión al antígeno puede tener la estructura de un fragmento de anticuerpo tal como Fab, F(ab')₂, y Fv que incluyen una región variable de cadena pesada y cadena ligera y son capaces de unirse al determinante epitópico en CD3. Estos fragmentos de anticuerpo conservan la capacidad de unirse de manera selectiva con el antígeno y se describen anteriormente. Se conocen en la técnica métodos de preparación de estos fragmentos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

En un grupo adicional de realizaciones, los dominios de unión a antígeno pueden tener la estructura de un anticuerpo Fv, que normalmente tienen aproximadamente 25 kDa y contiene un sitio de unión a antígeno completo con tres CDR por cada cadena pesada y cada cadena ligera. Para producir estos anticuerpos, la V_H y la V_L pueden expresarse a partir de dos construcciones de ácidos nucleicos individuales en una célula hospedadora. Si la V_H y la V_L se expresan de forma no contigua, las cadenas del anticuerpo Fv normalmente se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes. Sin embargo, estas cadenas tienden a disociarse tras la dilución, por lo que se han creado procedimientos para entrecruzar las cadenas a través de glutaraldehído, disulfuros intermoleculares o un enlazador peptídico. Por tanto, en un ejemplo, el Fv puede ser un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están químicamente unidas mediante enlaces disulfuro.

En un ejemplo adicional, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas mediante un enlazador peptídico. Se prepararon estas proteínas de unión a antígeno monocatenarias (scFv) construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados mediante un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedadora tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los enlazadores ilustrativos incluyen la secuencia de aminoácidos GGGGS (SEQ ID NO: 1) y GGGGGGGGS (SEQ ID NO: 2). Se conocen en la técnica métodos para producir scFv (véase Whitlow *et al.*, *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 97, 1991; Bird *et al.*, *Science* 242:423, 1988; la patente de los Estados Unidos n.º 4.946.778; Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11:1271, 1993; y Sandhu, *supra*). También se contemplan dímeros de un anticuerpo monocatenario (scFV₂).

Los fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de unión a antígeno se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante la expresión en *E. coli* de ADN que codifica el fragmento. También pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede

escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente (véase la patente de los Estados Unidos n.º 4.036.945 y la patente de los Estados Unidos n.º 4.331.647 y las referencias que se encuentran en las mismas; Nisonhoff *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman *et al.*, Methods in Enzymology, Vol. 1, página 422, Academic Press, 1967; y Coligan *et al.* en las secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4).

También pueden usarse otros métodos para escindir anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligera-pesada, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo inalterado.

El anticuerpo divulgado en el presente documento puede derivatizarse o unirse a otra molécula (tal como otro péptido o proteína). En general, el anticuerpo se derivatiza de manera que la unión al polipéptido de ROR1 y a la subunidad CD3 no se vean afectadas negativamente por la derivatización o el marcaje. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar unido funcionalmente, por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo, un agente de detección, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

El anticuerpo biespecífico puede producirse reticulando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (tal como éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (tal como suberato de disuccinimidilo). Estos enlazadores están disponibles, por ejemplo, de Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

En realizaciones particulares, el dominio de unión al antígeno ROR1 puede ser un anticuerpo scFv. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno CD3 es un anticuerpo scFv. En diversas realizaciones, tanto el dominio de unión al antígeno ROR1 como el dominio de unión al antígeno CD3 son anticuerpos scFv. Estos dos anticuerpos scFv pueden unirse covalentemente utilizando un enlazador peptídico corto de entre 5 y 20 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 75 o 76, o una secuencia que tenga al menos un 90 % de identidad de secuencia con las mismas. La secuencia puede tener al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 75 o 76.

El anticuerpo se puede marcar con un resto o marcador detectable como se describe anteriormente.

El anticuerpo también se puede marcar con un aminoácido radiomarcado. Los ejemplos de radiomarcadores incluyen, pero sin limitación, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I . El radiomarcador puede usarse con fines tanto diagnósticos como terapéuticos.

Los medios para detectar dichos marcadores son bien conocidos para los expertos en la materia. Por tanto, por ejemplo, pueden detectarse radiomarcadores usando película fotográfica o contadores de centelleo, pudiéndose detectar los marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan normalmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido mediante la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado.

El anticuerpo también se puede derivatizar con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo hidrato de carbono. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, tal como para aumentar la semivida sérica o para aumentar la unión a tejidos.

Polinucleótidos y Expresión

También se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo biespecífico, así como vectores de expresión que permiten su expresión eficaz en las células.

La expresión recombinante de un dominio de unión a antígeno generalmente requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Se proporcionan vectores replicables que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo o una CDR de cadena pesada o ligera, unidos de forma operativa a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.981.216; 5.591.639; 5.658.759 y 5.122.464) y el dominio variable

del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa o las cadenas tanto pesada como ligera completas.

Las moléculas de ácido nucleico (también denominadas polinucleótidos) que codifican los anticuerpos proporcionados en el presente documento (incluidos, pero sin limitación, los dominios de unión a antígeno) pueden producirse fácilmente por un experto en la materia. Por ejemplo, estos ácidos nucleicos se pueden producir utilizando las secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento (tal como las secuencias de CDR, las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera), las secuencias disponibles en la técnica (tales como las secuencias marco) y el código genético.

Un experto en la materia puede usar fácilmente el código genético para construir una diversidad de ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en la secuencia pero que codifican la misma secuencia de anticuerpos o codifican un conjugado o proteína de fusión que incluye la secuencia de los ácidos nucleicos de V_L y/o V_H .

Las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican los dominios de unión a antígeno que se unen específicamente a un polipéptido de ROR1 y CD3, pueden prepararse por cualquier método adecuado incluyendo, por ejemplo, clonación de secuencias apropiadas o mediante síntesis química directa mediante métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981; el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862, 1981, por ejemplo, usando un sintetizador automático como se describe en, por ejemplo, Needham-VanDevanter *et al.*, Nucl. Acids Res. 12:6159-6168, 1984; y el método de soporte sólido de la Patente de los Estados Unidos n.º 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este puede convertirse en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena simple como plantilla. Un experto reconocería que, aunque la síntesis química de ADN generalmente se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas mediante la unión de secuencias más cortas.

Pueden prepararse ácidos nucleicos ilustrativos mediante técnicas de clonación. Ejemplos de técnicas apropiadas de clonación y secuenciación, e instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Sambrook *et al.*, *supra*, Berger y Kimmel (eds.), *supra*, y Ausubel, *supra*. La información del producto de los fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información útil. Dichos fabricantes incluyen la SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia Amersham (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen (Carlsbad, CA) y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por un experto.

También pueden prepararse ácidos nucleicos mediante métodos de amplificación. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS, por sus siglas en inglés), el sistema de replicación de secuencias autosostenida (3SR). Los expertos en la materia conocen bien una amplia diversidad de métodos de clonación, células hospedadoras y procedimientos de amplificación *in vitro*.

Cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los dominios de unión a antígeno, V_H y/o V_L , divulgados en el presente documento (o un fragmento de los mismos) se puede expresar en una célula modificada por ingeniería de manera recombinante, tal como una bacteria, planta, levadura, células de insecto y de mamífero. Estos anticuerpos se pueden expresar como cadenas V_H y/o V_L individuales o pueden expresarse como una proteína de fusión. También puede expresarse una inmunoadhesina. Por tanto, en algunos ejemplos, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una V_H y V_L y una inmunoadhesina. Las secuencias de los ácidos nucleicos pueden codificar opcionalmente una secuencia líder.

Para crear un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L pueden unirse operativamente a otro fragmento que codifique un enlazador flexible, por ejemplo, que codifique la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de manera que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse en forma de una proteína monocatenaria contigua, con los dominios V_L y V_H unidos por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988; Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554 (1990). Opcionalmente, puede incluirse un sitio de escisión en un enlazador, tal como un sitio de escisión de furina. Para crear un anticuerpo biespecífico a partir de dos anticuerpos scFv, los fragmentos de ADN de scFv se pueden unir operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible que contiene entre 5 y 20 aminoácidos, de modo que las dos secuencias de scFv se expresan como una proteína monocatenaria contigua, con los dos anticuerpos scFv unidos por el enlazador flexible.

El ácido nucleico que codifica el V_H y/o el V_L puede codificar opcionalmente un dominio Fc (inmunoadhesina). El dominio Fc puede ser un dominio Fc de IgA, IgM o IgG. El dominio Fc puede ser un dominio Fc optimizado, como se

describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada n.º 20100/093979. En un ejemplo, la inmunoadhesina es un Fc de IgG₁.

- Se espera que los expertos en la materia conozcan los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas incluyendo *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levaduras y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y de mieloma. Una vez se ha transferido el vector de expresión a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales, las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales, tal como para producir un anticuerpo. Por tanto, se proporcionan células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un dominio de unión a antígeno, o una cadena pesada o ligera del mismo, o una porción del mismo, unido operativamente a un promotor heterólogo. En determinadas realizaciones para la expresión de dominios de unión a antígeno de doble cadena, pueden coexpresarse vectores que codifican las cadenas tanto pesada como ligera en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.
- Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para la expresión de anticuerpos recombinantes se conocen bien en la técnica e incluyen diversas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células epiteliales de riñón humano 293 y otras líneas celulares diferentes. Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación posteriores a la traducción de las proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas hospedadores adecuados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos del anticuerpo o porción del mismo expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación, células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce de manera endógena ninguna cadena de inmunoglobulina funcional), SP20, CRL7030 y HsS78Bst. En una realización, las líneas celulares humanas son útiles. En una realización, se puede utilizar la línea celular humana PER.C6. (Crucell, Países Bajos). Las líneas celulares adicionales que pueden usarse como hospedadores para la expresión de anticuerpos recombinantes incluyen, pero sin limitación, células de insecto (por ejemplo, Sf21/Sf9, *Trichoplusia ni* Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia*, patente de los Estados Unidos n.º 7.326.681), células vegetales (solicitud de patente de los Estados Unidos publicada n.º 20080066200); y células de pollo (publicación del PCT N.º WO2008142124).
- La célula hospedadora puede ser una bacteria grampositiva que incluye, pero sin limitación, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus* y *Oceanobacillus*. Se conocen bien en la técnica los métodos para expresar proteínas en bacterias grampositivas, tales como *Lactobacillus*, véase, por ejemplo, la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada n.º 20100/080774. Se describen vectores de expresión para *Lactobacillus*, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 6.100.388 y en la patente de los Estados Unidos n.º 5.728.571. Se pueden incluir secuencias líderes para expresión en *Lactobacillus*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero sin limitación, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria* y *Ureaplasma*.
- Se pueden expresar una o más secuencias de ADN que codifican los dominios de unión a antígeno *in vitro* por transferencia de ADN a una célula hospedadora adecuada. El término también incluye cualquier descendencia de la célula hospedadora sujeto. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica a la célula precursora puesto que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Se conocen en la técnica métodos de transferencia estable, lo que significa que el ADN extraño se mantiene continuamente en el hospedador.
- La expresión de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos aislados descritos en el presente documento se puede lograr mediante la unión operativa del ADN a un promotor (que es o constitutivo o inducible), seguida de su incorporación en un casete de expresión. El promotor puede ser cualquier promotor de interés, incluyendo un promotor de citomegalovirus y un promotor de virus linfotrófico de linfocitos T humanos (HTLV, por sus siglas en inglés)-1. Opcionalmente, se incluye en la construcción un potenciador, tal como un potenciador de citomegalovirus. Los casetes pueden ser adecuados para replicación e integración en procariontes o eucariotas. Los casetes de expresión típicos contienen secuencias específicas útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Por ejemplo, los casetes de expresión pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación, un codón de iniciación (es decir, ATG) frente a un gen que codifica proteínas, señal de corte y empalme para intrones, secuencias para el mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada de ARNm y codones de parada apropiados. El vector puede codificar un marcador seleccionable, tal como un marcador que codifica la resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a ampicilina o tetraciclina).
- Para obtener una expresión de alto nivel de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción (secuencias internas de unión a ribosomas) y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E.*

coli, esto incluye un promotor tal como los promotores T7, trp, lac o lambda, un sitio de unión a ribosomas y, preferentemente, una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y/o un potenciador derivado de, por ejemplo, un gen de inmunoglobulina, HTLV, SV40 o citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir adicionalmente secuencias donantes y/o

5 aceptoras de corte y empalme (por ejemplo, secuencias aceptoras y donantes de corte y empalme de CMV y/o HTLV). Los casetes pueden transferirse a la célula hospedadora elegida mediante procedimientos bien conocidos tales como transformación o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para células de mamífero. Las células transformadas por los casetes pueden seleccionarse por la resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los casetes, tales como los genes amp, gpt, neo e hyg.

10 Cuando el hospedador es un eucariota, pueden usarse dichos procedimientos de transfección de ADN como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas o vectores víricos. Las células eucariotas también se pueden cotransformar con secuencias de polinucleótidos que codifican el dominio de unión a antígeno, dominio de

15 unión a antígeno marcado, o fragmento funcional del mismo, y una segunda molécula de ADN extraño que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de la timidina cinasa del herpes simple. Otro procedimiento es usar un vector vírico eucariota, tal como el virus de simio 40 (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente las células eucariotas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982). Un experto en la materia puede usar fácilmente sistemas de expresión tales

20 como plásmidos y vectores de uso en la producción de proteínas en células incluyendo células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y de mieloma.

Pueden hacerse modificaciones a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento sin disminuir su actividad biológica. Pueden hacerse algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o

25 incorporación de la molécula de direccionamiento a una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de inicio, aminoácidos adicionales colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción convenientemente ubicados o aminoácidos adicionales (tales como poli His) para ayudar en las etapas de purificación. Además de los métodos recombinantes, los inmunocnjugados, los restos efectores y los dominios de

30 unión a antígeno de la presente divulgación también pueden construirse total o parcialmente usando la síntesis peptídica convencional bien conocida en la técnica.

Una vez expresados, los dominios de unión a antígeno y/o los anticuerpos se pueden purificar según procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en

35 columna y similares (véase, generalmente, R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y., 1982). No es necesario que los dominios de unión a antígeno y los anticuerpos sean 100 % puros. Una vez purificados, parcialmente o a la homogeneidad que se desee, si han de usarse terapéuticamente, los anticuerpos deberían estar sustancialmente libres de endotoxina.

40 Se han descrito métodos para la expresión de anticuerpos y/o el replegamiento a una forma activa apropiada, incluyendo anticuerpos monocatenarios, a partir de bacterias tal como *E. coli* y son bien conocidos y son aplicables a los dominios de unión a antígeno divulgados en el presente documento. Véanse, Buchner *et al.*, Anal. Biochem. 205:263-270, 1992; Pluckthun, Biotechnology 9:545, 1991; Huse *et al.*, Science 246:1275, 1989 y Ward *et al.*, Nature 341:544, 1989.

45 Con frecuencia, se aíslan proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias de los cuerpos de inclusión y requieren solubilización usando desnaturalizantes fuertes y replegamiento posterior. Durante la etapa de solubilización, como es bien sabido en la técnica, debe haber presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un tampón ilustrativo con un agente reductor es: Tris 0,1 M pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE

50 (ditioeritritol) 0,3 M. La reoxidación de los enlaces disulfuro puede producirse en presencia de reactivos de tior de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena *et al.*, Biochemistry 9: 5015-5021, 1970 y especialmente como se describe por Buchner *et al.*, *supra*.

La renaturalización se logra normalmente por dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y

55 reducida en tampón de replegamiento. Un tampón ilustrativo es Tris 0,1 M, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado (GSSG) 8 mM y EDTA 2 mM.

Como una modificación al protocolo de purificación de anticuerpos de dos cadenas, las regiones de cadena pesada y ligera se solubilizan y reducen por separado y después se combinan en la solución de replegamiento. Se obtiene un

60 rendimiento ilustrativo cuando estas dos proteínas se mezclan en una relación molar tal que no se excede un exceso molar de 5 veces de una proteína sobre la otra. Se puede añadir glutatión oxidado en exceso u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular a la solución de replegamiento después de completarse la mezcla redox.

Además de los métodos recombinantes, los anticuerpos que se divulgan en el presente documento también se pueden

65 construir en su totalidad o en parte utilizando la síntesis de péptidos convencional. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de menos de aproximadamente 50 aminoácidos puede lograrse fijando el aminoácido carboxiterminal de

la secuencia a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Barany & Merrifield describen técnicas para la síntesis en fase sólida, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A. págs. 3-284; Merrifield *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156, 1963 y Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984. Las proteínas de mayor longitud pueden sintetizarse mediante condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Se conocen bien en la técnica métodos para formar enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo carboxilo terminal (tal como mediante el uso del reactivo de acoplamiento N,N'-diciclohexilcarbodiimida). Una vez se ha producido una molécula de anticuerpo, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad por los antígenos específicos proteína A o proteína G, y cromatografía en columna por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Asimismo, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias de polipéptidos heterólogas (citadas en el presente documento como "etiquetas") descritas anteriormente o conocidas de otro modo para facilitar la purificación.

Composiciones y Métodos Terapéuticos

También se divulga un método para tratar cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo divulgado y/o un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tratando, de este modo, el cáncer.

Los anticuerpos divulgados pueden ser citotóxicos para las células cancerosas.

Preferentemente, el cáncer es leucemia (tal como leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia de células del manto o tricoleucemia), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, glioblastoma, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer suprarrenal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, neuroblastoma, sarcoma, cáncer renal. Asimismo, ROR1 se expresa en un subconjunto de células madre cancerosas.

La presente invención también se refiere al anticuerpo divulgado para su uso en el tratamiento de cáncer. Asimismo, en el presente documento se describe el uso del anticuerpo divulgado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

Preferentemente, el cáncer es leucemia (tal como leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia de células del manto o tricoleucemia), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, glioblastoma, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer suprarrenal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, neuroblastoma, sarcoma, cáncer renal. Asimismo, ROR1 se expresa en un subconjunto de células madre cancerosas.

No es necesario eliminar completamente el cáncer o el tumor para que la composición sea eficaz. Por ejemplo, el anticuerpo puede reducir el tumor en una cantidad deseada, por ejemplo, en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o el 100 %, en comparación con la ausencia de la composición.

La administración del anticuerpo de la presente invención puede dar como resultado un agotamiento del 5, 10, 20, 50, 75, 90, 95 o 99 %, es decir, de reducción de células malignas.

En otro ejemplo, al sujeto también se le puede administrar una cantidad eficaz de un agente adicional, tal como un agente de quimioterapia. Los métodos pueden incluir la administración de uno o más agentes adicionales conocidos en la técnica.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo (o del ácido nucleico que codifica el anticuerpo) dependerá de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede proporcionar alivio subjetivo de uno o más síntomas o una mejora objetivamente identificable según lo observado por el médico u otro observador cualificado. Como se señala anteriormente, estas composiciones se pueden administrar junto con otro agente terapéutico, de manera simultánea o secuencial. Para cualquier aplicación, el anticuerpo puede combinarse con quimioterapia.

Se administran administraciones únicas o múltiples de las composiciones que incluyen el anticuerpo, que se divulgan en el presente documento, dependiendo de la dosis y la frecuencia requerida y tolerada por el paciente. En cualquier caso, la composición debe proporcionar una cantidad suficiente de al menos uno de los anticuerpos divulgados en el presente documento para tratar de manera eficaz al paciente. La dosificación se puede administrar una vez, pero se puede aplicar periódicamente hasta que se logre un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifiquen la interrupción del tratamiento. En un ejemplo, se infunde una dosis del anticuerpo durante treinta minutos cada dos días. En este ejemplo, se pueden administrar de aproximadamente una a aproximadamente diez dosis, tales como tres o seis dosis se pueden administrar cada dos días. En un ejemplo más, se administra una infusión continua

durante de aproximadamente cinco a aproximadamente diez días. El sujeto se puede tratar a intervalos regulares, tal como mensualmente, hasta lograr el resultado terapéutico deseado. Generalmente, la dosis es suficiente para tratar o mejorar los síntomas o signos de la enfermedad sin producir una toxicidad inaceptable para el paciente.

- 5 Se divulgan además composiciones que incluyen el anticuerpo o el ácido nucleico que codifica el anticuerpo en un transportador. Las composiciones pueden prepararse en formas de dosificación unitarias para la administración a un sujeto. La cantidad y el momento de la administración quedan a discreción del médico responsable para conseguir el fin deseado. El anticuerpo y/o el ácido nucleico se pueden formular para administración sistémica o local. En un ejemplo, el anticuerpo o ácido nucleico que codifica el anticuerpo está formulado para administración parenteral, tal como administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración es intramuscular.

- 15 Los principios activos también pueden encerrarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980). De manera específica, los liposomas que contienen los anticuerpos se pueden preparar mediante métodos como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); y en las patentes de los Estados Unidos números 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se divulgan en la patente de los Estados Unidos n.º 5.013.556. El método de evaporación en fase inversa se puede utilizar con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEGPE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los polipéptidos se pueden conjugar con los liposomas como se describe, por ejemplo, en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro.

- 30 Las composiciones para administración pueden incluir una solución del anticuerpo disuelto en un transportador farmacéuticamente aceptable, tal como un transportador acuoso. Puede usarse una variedad de transportadores acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables necesarias para aproximar las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la toxicidad, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluidos, viscosidades, peso corporal y similares, según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del sujeto. En algunas realizaciones, la administración es intravenosa.

- 40 Pueden prepararse formulaciones parenterales de liberación controlada en forma de implantes, inyecciones oleosas o sistemas de partículas. Para obtener una visión general de los sistemas de suministro de proteínas, véanse, Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pensilvania, (1995). Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, como núcleo central. En las microesferas, el producto terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas menores de aproximadamente 1 µm generalmente se denominan nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, por lo que solo se administran nanopartículas por vía intravenosa. Las micropartículas tienen normalmente aproximadamente 100 µm de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véanse, por ejemplo, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, págs. 219-342 (1994); y Tice y Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, págs. 315-339, (1992).

- 55 Pueden usarse polímeros para la liberación controlada por iones del anticuerpo divulgado en el presente documento. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en el suministro controlado de fármacos (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, poloxámero 407, existe como un líquido viscoso pero móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y el suministro sostenido de interleucina-2 y ureasa recombinantes (Johnston *et al.*, Pharm. Res. 9:425-434, 1992; y Pec *et al.*, J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990). Como alternativa, se ha utilizado hidroxipatita como microtransportador para la liberación controlada de proteínas (Ijntema *et al.*, Int. J. Pharm. 112:215-224, 1994). En otro aspecto más, se usan liposomas para la liberación controlada, así como para el direccionamiento farmacológico del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri *et al.*, Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)).

- 65 Una composición farmacéutica típica para administración intravenosa incluye de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg de anticuerpo por día, o de 0,5 a 15 mg/kg de anticuerpo por día. Se pueden usar dosis desde 0,1 hasta aproximadamente 100 mg/kg por sujeto por día, particularmente si el agente se administra en un sitio apartado y no en el sistema circulatorio o linfático, tal como en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano. Las dosis ilustrativas incluyen de

1 a 10 mg/kg, tal como de 2 a 8 mg/kg, tal como de 3 a 6 mg/kg. Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en publicaciones tales como *Remington's Pharmaceutical Science*, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995).

Los anticuerpos pueden proporcionarse en forma liofilizada y rehidratarse con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en soluciones estériles de concentración conocida. A continuación, la solución de anticuerpos se añade a una bolsa de infusión que contiene cloruro de sodio al 0,9 %, USP, y normalmente se administra a una dosis de 0,1 a 10 mg/kg o de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal. Las dosis ilustrativas incluyen de 1 a 10 mg/kg, tal como de 2 a 8 mg/kg, tal como de 3 a 6 mg/kg. Se dispone de considerable experiencia en la técnica en la administración de fármacos de anticuerpos, los fármacos de anticuerpos se han comercializado en los Estados Unidos desde la aprobación de RITUXAN® en 1997. Los anticuerpos pueden administrarse por infusión lenta, en lugar de un impulso o bolo intravenoso. En un ejemplo, se administra una dosis de carga más alta, con dosis de mantenimiento posteriores, que se administran a un nivel más bajo. Por ejemplo, se puede infundir una dosis de carga inicial de 4 mg/kg durante un período de unos 90 minutos, seguida de dosis de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidas durante un período de 30 minutos si se toleró bien la dosis previa.

Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a un sujeto que lo necesite. Un enfoque para la administración de ácidos nucleicos es la inmunización directa con ADN plasmídico, tal como con un plásmido de expresión de mamífero. La secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo se puede colocar bajo el control de un promotor para aumentar la expresión de la molécula. La inmunización mediante construcciones de ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica y se enseña, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 5.643.578 y en la patente de los Estados Unidos n.º 5.593.972 y en la patente de los Estados Unidos n.º 5.817.637. La patente de los Estados Unidos n.º 5.880.103 describe varios métodos de suministro de ácidos nucleicos a un organismo. Los métodos incluyen el suministro liposómico de los ácidos nucleicos.

En otro enfoque para el uso de ácidos nucleicos, un anticuerpo también puede expresarse por hospedadores o vectores víricos o vectores bacterianos atenuados, que pueden administrarse de forma segura a un sujeto. Puede usarse el virus vaccinia recombinante, virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés), virus del herpes, retrovirus, citomegalovirus, poxvirus u otros vectores víricos para expresar el anticuerpo. Por ejemplo, dichos vectores de vaccinia se describen en la patente de los Estados Unidos n.º 4.722.848. El BCG (Bacilo Calmette Guérin) proporciona otro vector para la expresión de los anticuerpos divulgados (véase, Stover, *Nature* 351:456-460, 1991).

En una realización, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo se introduce directamente en las células. Por ejemplo, el ácido nucleico puede cargarse en microesferas de oro mediante métodos convencionales e introducirse en la piel mediante un dispositivo tal como el cañón de genes Helios® de Bio-Rad. Los ácidos nucleicos pueden estar "desnudos", consistiendo en plásmidos bajo el control de un promotor fuerte.

Normalmente, el ADN se inyecta en el músculo, aunque también puede inyectarse directamente en otros sitios. Las dosis para inyección suelen ser de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, y normalmente son de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.589.466).

En algunos ejemplos, a un sujeto se le administra el ADN que codifica el anticuerpo para proporcionar producción de anticuerpos *in vivo*, por ejemplo, usando la maquinaria celular del sujeto. La inmunización mediante construcciones de ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica y se enseña, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 5.643.578 y en la patente de los Estados Unidos n.º 5.593.972 y en la patente de los Estados Unidos n.º 5.817.637. La patente de los Estados Unidos n.º 5.880.103 describe varios métodos de suministro de ácidos nucleicos que codifican un organismo. Los métodos incluyen el suministro liposómico de los ácidos nucleicos. Dichos métodos pueden aplicarse a la producción de un anticuerpo, o fragmentos de unión de anticuerpo del mismo, por un experto habitual en la materia.

Un enfoque para la administración de ácidos nucleicos es la administración directa con ADN plasmídico, tal como con un plásmido de expresión de mamífero. La secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo divulgado puede colocarse bajo el control de un promotor para aumentar la expresión.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características y/o realizaciones particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la divulgación a las características o realizaciones particulares descritas. Los ejemplos deben leerse en combinación con las figuras que son las siguientes:

Figura 1: Citotoxicidad específica mediada por ROR1xCD3 contra líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, por sus siglas en inglés) en un ensayo de cultivo conjunto con linfocitos T no estimulados. (a) Ensayo MTS que demuestra una marcada citotoxicidad contra las líneas celulares PANC-1 con ROR1xCD3 y linfocitos T, pero no con linfocitos T solos o con CD19xCD3. (b) Secreción específica de IL-2 e IFN γ por linfocitos T en respuesta a células PANC-1 en presencia de ROR1xCD3. (c) Titulación de ROR1xCD3 en ensayos de cultivo conjunto utilizando un panel de líneas celulares PDAC ROR1 positivas, conservando ROR1xCD3 su actividad

citotóxica a concentraciones tan bajas como 0,1 ng/ml. Datos representativos de 2 experimentos independientes con diferentes linfocitos T de donantes.

Figura 2: Evaluación *in vivo* de ROR1xCD3. (a) Injerto intraperitoneal: se administraron 2×10^6 células PANC-1.Luc/ratón seguido de inyección ip de linfocitos T humanos purificados (8×10^6 grupo con CTRL BiTE; 8×10^6 y 4×10^6 grupos con BiTE ROR1xCD3 1 y 2 respectivamente). Se inyectaron ROR1xCD3 y CD19xCD3 diariamente a 10 µg/kg/ratón. El injerto de PANC-1.Luc se evaluó mediante obtención de imágenes bioluminiscentes (BLI, por sus siglas en inglés) *in vivo* en los días 3, 5 y 8 después de la inyección. (b) Establecer el modelo de xenoinjerto: Se inyectaron líneas celulares PANC-1 (5×10^6) en el flanco derecho de ratones lampiños atímicos inmunocomprometidos y se establecieron xenoinjertos con un tamaño mínimo de 100 mm³. Los ratones recibieron una única inyección intravenosa de linfocitos T purificados (5×10^6) y se trataron con ROR1xCD3, CD19xCD3 o PBS a 10 µg/kg/día iv diariamente durante 7 días y se midió el tamaño del tumor con calibre. (c) Modelo de xenoinjerto establecido: El seguimiento de estos animales mostró que los ratones tratados con ROR1xCD3 tenían volúmenes tumorales más bajos en comparación con las cohortes de control el día 28.

Figura 3: Citotoxicidad contra líneas celulares de neuroblastoma ROR1 positivas.

Ejemplos

Materiales y métodos

Generación de scFv

Las ratas se inmunizaron contra ROR1 de longitud completa mediante Aldevron GmbH y los clones oligoclonales de los hibridomas posteriores se clasificaron en células sueltas y las secuencias variables se aislaron mediante amplificación inversa 5' de extremos de ADNc utilizando protocolos de laboratorio convencionales. Las secuencias productivas se clonaron en anticuerpos y se evaluó la unión específica de ROR1 antes de convertirlas en fragmentos variables monocatenarios en un formato de cadena pesada-enlazador-cadena ligera.

Líneas celulares y reactivos

Las células PANC-1, SKOV-3 y HEK293T se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC; Teddington, Middlesex, Reino Unido). Las líneas celulares SUIT-2, CFPAC1, HPAF-II MiaPaCa-2, PSN-1 las proporcionó amablemente el profesor Aldo Scarpa (Department of Pathology and Diagnostics, University and Hospital Trust of Veron, Verona, Italia). Las células HEK293T se mantuvieron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (ThermoScientific, Paisley, Reino Unido) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (ThermoScientific). Todas las demás líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI-1640 (ThermoScientific) complementado con FBS al 10 %. Las células se cultivaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se evaluó la expresión de ROR1 en las líneas celulares mediante tinción con el anticuerpo anti-ROR1 clon 2A2 (Biolegend, Reino Unido) mediante citometría de flujo.

Generación de ROR1xCD3

Los ScFv contra ROR1 y CD19 fmc63 de control se acoplaron al ScFv anti-CD3 humano (Clon OKT3) a través de un enlazador de aminoácidos corto usando gBlocks (Integrated DNA Technologies, Lovaina, Bélgica) y PCR de extensión solapante utilizando ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs, Ipswich, RU). El marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) de BiTE se clonó en el vector retroviral SFG cadena arriba de un ORF de GFP, por digestión de restricción con NcoI/MluI. Los dos ORF están separados por una región IRES para obtener SFG.ROR1xCD3.IRES.GFP o SFG.CD19xCD3.IRES.GFP. Se incluyó una etiqueta de hexahistidina aminoterminal para permitir la detección y purificación.

Generación de células HEK293T productoras de BiTE estables.

El sobrenadante retroviral se produjo en células HEK293T utilizando la envoltura del retrovirus RD114 (RDF), PegPam3 gag-pol y el vector SFG.ROR1xCD3.IRES.GFP o SFG.CD19xCD3.IRES.GFP siguiendo los protocolos convencionales de laboratorio. Los sobrenadantes que contenían retrovirus se recogieron 48 y 72 horas después de la transfección, se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Se sembraron células HEK293T ($1,8 \times 10^6$) en placas de 10 cm en medio nuevo y se transdujeron con 2 ml de sobrenadante que contenía retrovirus a las 24 y 48 horas después de la siembra. Después, las células transducidas se incubaron durante 72 horas en una estufa de incubación humidificada a 37°C con CO₂ al 5 %, se clasificaron según la expresión de GFP y se analizaron para determinar la producción de BiTE.

Producción, purificación y unión de ROR1xCD3

Los medios con HEK293T que contenían ROR1xCD3 o CD19xCD3 se recogieron y purificaron mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, por sus siglas en inglés) utilizando columnas de unión HiTrap Talon con un explorador AKTA (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). La calidad de los BiTE se evaluó mediante tinción con

Coomassie después de SDS-PAGE y se cuantificó utilizando patrones de dilución BSA (ThermoScientific). Se utilizó el programa informático ImageJ para el análisis de datos (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU.). ROR1xCD3 y CD19xCD3 se validaron mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-His conjugado con HRP (Biolegend, Reino Unido). La unión específica de ROR1xCD3 o CD19xCD3 a las células diana se evaluó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo antietiqueta His (Abcam, Cambridge, RU).

Purificación de linfocitos T

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de donantes sanos después de la centrifugación de sangre fresca en un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Los linfocitos T se purificaron utilizando un kit de aislamiento de linfocitos Pan T humanos (Miltenyi Biotec, Surrey, Reino Unido), y se comprobó mediante citometría de flujo la calidad del aislamiento. De acuerdo con informes anteriores, los linfocitos T recién aislados se expandieron solo para el trabajo con animales: los linfocitos T se sembraron a 1×10^6 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se expandieron utilizando perlas con CD3/CD28 (ThermoScientific, Reino Unido) y se mantuvieron en cultivo durante 1 semana antes de inyectarlas en los ratones. Se usaron linfocitos T no estimulados para todos los experimentos *in vitro*.

Citometría de flujo

Los datos se capturaron en un citómetro de flujo LRS Fortessa II (Becton Dickinson, Oxford, RU) y se analizaron con el programa informático FlowJo (Flowjo LLC, Ashland, Orgeon). La clasificación de células activadas por fluorescencia se llevó a cabo en un clasificador de células FACSaria (Becton Dickinson).

Ensayo de cultivos conjuntos

Los ensayos de cultivo conjuntos se realizaron en placas de 96 pocillos, que contenían 1×10^4 células diana, 1×10^4 linfocitos T y ROR1xCD3 BiTE purificado (o CD19xCD3 como control) a una concentración de 0,1 ng/ml a 1 µg/ml, como se indica en el manuscrito. Veinticuatro horas después de la adición de ROR1xCD3 o CD19xCD3, se recogió el sobrenadante para la evaluación de citocinas, que se realizó mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Biolegend, RU). Para evaluar la citotoxicidad, se utilizó el ensayo de proliferación celular (MTS) CellTiter 96® AQueous One Solution siguiendo el protocolo del fabricante (Promega, Reino Unido).

Estadísticas

El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism versión 6 para Windows (programa informático GraphPad, La Jolla California, Estados Unidos). La significación estadística se consideró cuando $p < 0,05$ y las barras de error representan el error estándar de la media.

Estudios en animales

Todo el trabajo con animales se realizó bajo la autoridad de las regulaciones del Home Office Project and Personal License del Reino Unido y cumplió con las normas del University College de Londres. Los ratones se obtuvieron de Charles River Laboratories Inc. Ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} hembra de seis a ocho semanas de edad recibieron 2×10^6 células PANC-1.Luc mediante inyección intraperitoneal. A los 3, 5 y 8 días o 14 días después, se detectó la expresión de luciferasa de PANC-1.Luc usando D-Luciferina (Melford Laboratories), que se inyectó por vía intraperitoneal (IP) a una dosis de 200 µg/ratón, y se tomaron imágenes utilizando el sistema de obtención de imágenes IVIS 100 Series (Perkin Elmer). Se utilizó el programa informático Living Image 4.4 para cuantificar las señales de imágenes de bioluminiscencia (BLI), y se creó la detección de ROI para la cuantificación en comparación con la intensidad de BLI. Para estudios de xenoinjerto se inyectaron 5×10^6 de células PANC-1 en el flanco de ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} de 6-8 semanas de edad. Una vez establecido el xenoinjerto (tamaño mínimo 100 mm³) los ratones recibieron 5×10^6 linfocitos T mediante una sola inyección en la vena de la cola, seguido de una inyección diaria de PBS o ROR1xCD3/CD19xCD3 suspendido en BSA al 0,1 % en PBS (10 µg/kg/ratón). El volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula elipsoidal (largo x ancho²)/2.

Resultados y análisis

A partir de un panel de anticuerpos anti-ROR1 aislados de una biblioteca de hibridomas de rata, se determinaron dos candidatos principales que se unían al dominio similar a inmunoglobulina distal de membrana o al dominio Frizzled más proximal de ROR1. Estos se convirtieron en un formato de fragmentos variables monocatenarios (scFv) antes del acoplamiento con un scFv de CD3 en una estructura en tándem separada por un enlazador corto. Dentro de este ROR1-BiTE, se incluyó una etiqueta de hexahistidina aminoterminal para permitir la detección y purificación, lo que no comprometió la capacidad de unirse de forma independiente a CD3 o ROR1 con cada brazo. La comparación directa de los dos ROR1-BiTE mostró una citotoxicidad superior con el BiTE de unión proximal a la membrana específico para el dominio Frizzled, que se seleccionó para una evaluación adicional (ROR1xCD3).

Los inventores se centraron en el cáncer de páncreas y el cultivo conjunto de células PANC-1 ROR1 positivas, una

línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático, con linfocitos T no estimuladas en una relación efector:diana (E:T, por sus siglas en inglés) de 1:1 en presencia de ROR1xCD3 demostró una citotoxicidad significativa evaluada mediante un ensayo de viabilidad celular a las 24 horas en comparación con un control CD19 BiTE (CD19xCD3) ($p < 0,001$) (figura 1a). La citotoxicidad se asoció con un aumento de 15 veces de interferón- γ (IFN γ) y un aumento de 11 veces de interleucina-2 (IL-2) en comparación con los cultivos conjuntos con CD19xCD3 (figura 1b). Cabe destacar que, no se observó citotoxicidad en cultivos conjuntos con linfocitos T solos o con ROR1xCD3 solo, confirmando que tanto ROR1xCD3 como los linfocitos T son necesarios para la función efectora. Se observó citotoxicidad dependiente de la dosis con ROR1xCD3 en un amplio panel de líneas celulares pancreáticas positivas que comprende, PANC-1, SUIT-2, CFPAC1, HPAF-II, MiaPaCa2 y PSN-1, con actividad significativa incluso a concentraciones de 0,1 ng/ml (figura 1c).

Los modelos de cáncer de páncreas están limitados en su reproducción del entorno tumoral complejo, sin embargo, para proporcionar una prueba preliminar de eficacia y de acuerdo con otros estudios, ROR1 BiTE se evaluó en dos modelos de xenoinjerto. En primer lugar, se inyectaron 2×10^6 células PANC-1 luciferasa de luciérnaga positivas (PANC-1.Luc) en la cavidad peritoneal de ratones lampiños atímicos seguido de una administración en bolo único de 4×10^6 (relación E:T de 2:1) u 8×10^6 (relación E:T de 4:1) linfocitos T humanos. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal diaria de ROR1xCD3 o CD19xCD3 de control a una dosis de 10 $\mu\text{g/kg/ratón}$. El análisis del día 8 reveló que el injerto de PANC-1.Luc, según se evaluó mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) no invasiva, se redujo de manera dependiente de la dosis de linfocitos T en 11 o 15 veces en las cohortes de ratones 2:1 y 4:1, respectivamente, en comparación con animales que recibieron CD19xCD3 (figura 2a).

Después se llevó a cabo un modelo subcutáneo más complejo en el que se inyectaron 5×10^6 células PANC-1 en el flanco derecho de ratones lampiños atímicos y se les permitió establecerse hasta un tamaño mínimo de 100 mm^3 . Posteriormente, los animales recibieron una administración única en la vena de la cola de 5×10^6 linfocitos T purificados seguida de administración intraperitoneal de ROR1xCD3 a una dosis de 10 $\mu\text{g/kg/ratón}$ diariamente durante 7 días sin apoyo con citocinas exógenas. Las cohortes de control recibieron CD19xCD3 en una pauta posológica idéntica o excipiente (PBS). El tratamiento con ROR1xCD3 redujo el crecimiento de los xenoinjertos en $> 50 \%$ durante el período de tratamiento a los 7 días en comparación con los animales de control (tamaño medio 62,2 mm^3 frente a 119,7 mm^3 , $p = 0,003$) (figura 2b). Por otra parte, un seguimiento más largo de estos animales mostró que a pesar de únicamente 7 días de tratamiento, los ratones tratados con ROR1xCD3 tenían volúmenes tumorales más bajos en comparación con las cohortes de control el día 28 (tamaño medio 171,2 mm^3 frente a 361,2 mm^3 , $p = 0,037$), lo que sugiere que el tratamiento transitorio con ROR1xCD3 puede dar lugar a una respuesta antitumoral duradera. Esto se produjo en el contexto de una infusión única de linfocitos T a dosis baja y con una dosis relativamente baja de BiTE (figura 2c).

No se observó toxicidad en términos de comportamiento, apariencia física o sufrimiento en cualquiera de estos modelos de ratón a pesar de que el ScFv de ROR1 se une tanto a ROR1 humano como murino.

Dado que ROR1 se expresa en una variedad de neoplasias malignas sólidas, independientemente de la célula de origen, se investigó la aplicabilidad más amplia del uso de ROR1xCD3 contra líneas celulares representativas de melanoma (T618A), glioblastoma (U-251, A 172), cánceres de ovario (SKOV-3, HOC-7, HEY), próstata (DU145, PC-3), mama (MDA-MB-231) y de hígado (HUH7, SK-Hep-1), todas ellas ROR1 positivas. ROR1xCD3 fue capaz de generar una citotoxicidad significativa mediada por linfocitos T contra todas estas líneas celulares en comparación con el tratamiento con CD19xCD3. La especificidad se demostró además ya que no se observó citotoxicidad frente a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama ROR1 negativa.

En conclusión, se describe la creación y la caracterización de un BiTE novedoso que provoca citotoxicidad tumoral después de unirse simultáneamente tanto a linfocitos T como a células tumorales ROR1 positivas. Esto evita el potencial de activación no deseada de linfocitos T y hace que las moléculas BiTE sean exquisitamente selectivas para ROR1, una diana que se expresa a altos niveles en una variedad de tumores, incluido el cáncer de páncreas. La eficacia se estableció adicionalmente en dos modelos de xenoinjerto de cáncer de páncreas con disminuciones significativas y duraderas en la carga tumoral a pesar de que los animales solamente recibieron una única infusión de dosis baja de linfocitos T y dosis relativamente bajas de BiTE.

Según el conocimiento de los presentes inventores, esta es la primera evidencia directa de eficacia con un BiTE que se dirige a ROR1, una molécula que se expresa a altos niveles en tumores agresivos y está asociada con la transición epitelial-mesenquimal y la metástasis. Un verdadero atractivo de los ROR1-BiTE es su potencial para dirigirse a las células madre cancerosas, que expresan ROR1 en el contexto del cáncer de ovario y el glioblastoma y aumentan el potencial para dirigirse a células madre iniciadoras de cáncer resistentes a quimioterapia/radioterapia.

Los linfocitos T con receptor de antígenos quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) específico de ROR1 se están probando contra neoplasias malignas hematológicas y sólidas (NCT02194374, NCT02706392); sin embargo, los BiTE ofrecen ventajas, ya que son más fáciles de fabricar a escala, más simple de administrar y evita la necesidad de una manipulación costosa y lenta de linfocitos T específicos del paciente, que incluye la expansión y la transducción ex vivo. Asimismo, los BiTE se eliminan rápidamente del organismo, minimizando el riesgo de toxicidad adversa inesperada.

Ejemplo 2**Maapeo de epítomos**

- 5 Para evaluar el epítomo de los anticuerpos generados, se produjeron líneas celulares con ROR1 truncado: estas comprendían células SUPT1 que expresaban ROR1 de longitud completa (dominio de inmunoglobulina, dominio Frizzled y dominio Kringle), SupT1 solamente con inmunoglobulina, SupT1 solamente con Frizzled, SupT1 solamente con Kringle y combinaciones (SupT1 con Ig y Frizzled y SupT1 con Frizzled y Kringle). Esto demostró que el Clon F se unió al dominio Frizzled. Esto es diferente a los anticuerpos R12 y 4A5 de la técnica anterior que se unen al dominio de inmunoglobulina. Por lo tanto, el clon F muestra características de unión diferentes y distintas en comparación con los anticuerpos R12 y 4A5 de la técnica anterior.

- 15 Para caracterizar aún más el epítomo al que se unió el clon F de manera específica, se compararon el ROR1 de rata con el ROR1 humano para evaluar las diferencias en los aminoácidos entre estas dos especies. Se realizó una serie de construcciones de ROR1 humano mutado que incluían sustituciones de un solo aminoácido en supuestos aminoácidos a los que estos anticuerpos podrían unirse para caracterizar adicionalmente el epítomo en cuestión.

- 20 Para el clon F, se generaron mutaciones puntuales para el dominio Fz de ROR1 humano en las posiciones 254 y 261. Las mutaciones particulares utilizadas fueron I(254)V y Q(261)H.

- Se encontró que la sustitución Q(261)H redujo o detuvo la unión del anticuerpo del clon F al dominio ROR1-Fz, mientras que la sustitución I(254)V no pareció afectar a la unión. Asimismo, la combinación de Q(261)H e I(254)V también impidió la unión de anticuerpos. Por lo tanto, Gln-261 es esencial para la unión de anticuerpos.

Ejemplo 3**El clon F es exclusivo de otros anticuerpos generados (murinos y de conejo) debido a la homología de secuencia**

- 30 Las secuencias de la proteína ROR1 humana, murina, de conejo y de rata se alinearon utilizando el programa informático basado en la web de Uniprot (<http://www.uniprot.org/align/>) y se destacó la variación entre las diferentes especies. Números de registro de Uniprot: humana (Q01973), murina (Q9Z139) y de conejo (G1U5L1). Para ROR1 de rata, se usó la secuencia de referencia del NCBI NP_001102141.1 ya que la secuencia Uniprot correspondiente solamente estaba parcialmente completa.

- 35 El clon F se une a Q261, lo que fue posible debido a las diferencias entre los aminoácidos de rata y humanos en esta posición (el aminoácido humano en la posición 261 es glutamina (Q) mientras que el aminoácido correspondiente en esta posición en rata es histidina (H)). Cuando se inmunizan ratas con ROR1 humano, esta diferencia de aminoácidos se reconoce como un inmunógeno con respecto a la secuencia ROR1 de rata, contra la que se produce un anticuerpo.

- 40 El anticuerpo conocido R12 (conejo) y los aglutinantes de ROR1 murino muestran homología con ROR1 humano en este sitio (es decir, todos tienen glutamina (Q) en esta posición). Como resultado, la inmunización de conejos o ratones con ROR1 humano no da como resultado la producción de anticuerpos dirigidos a esta posición ya que no es inmunogénico. En vista de esto, el clon F es exclusivo en su capacidad para unirse a este epítomo.

Ejemplo 4**El clon F BITE da lugar a una citotoxicidad significativa de líneas celulares de neuroblastoma ROR1 positivas**

- 50 El clon F ROR1 BITE da lugar a una citotoxicidad significativa de las líneas celulares de neuroblastoma NB-1643 y NB-7 ROR1 positivas, pero no de las líneas celulares Rh30 ROR1 negativas, incluso a concentraciones de 0,01 microgramos/ml (véase la figura 3).

Ejemplo 5**La humanización del Clon F confiere ventajas en comparación con las construcciones de comparación no humanizadas**

- 60 Una de las razones para dirigirse a ROR1 en lugar de CD19, es excluir la población normal de linfocitos B ROR1 negativos. Sin embargo, al mismo tiempo, la presencia continua de células B CD19+ normales permite respuestas inmunitarias dirigidas contra un scFv derivado de rata.

- 65 Esto se ha visto con scFv murinos y ha dado lugar a resultados clínicamente significativos, incluida la anafilaxia con linfocitos CAR T de mesotelina modificados con ARNm (Maus *et al.*, 2013) o respuestas de anticuerpos, con receptor de α -folato o linfocitos CAR T específicos de anhidrasa carbónica IX (Lamers *et al.*, 2006, Kershaw *et al.*, 2006). Las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T también son posibles debido a la presentación cruzada de

componentes de CAR en MHC. Los linfocitos CAR T CD19 en comparación, neutralizan inherentemente el riesgo de respuestas inmunitarias basadas en anticuerpos al erradicar la población normal de linfocitos B, con la recurrencia de linfocitos B asociada con un mayor riesgo de recaída.

- 5 Al llevar a cabo la humanización del Clon F, se ha disminuido la probabilidad de respuestas inmunitarias contra el BiTE, lo que da lugar a una persistencia potenciada y una menor inmunogenicidad.

Listado de secuencias

- 10 Las secuencias de aminoácidos enumeradas a continuación, se muestran usando códigos patrón de una letra para aminoácidos. Las secuencias son para el clon F y las cinco secuencias variables humanizadas que se crearon.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del Clon F descritas anteriormente y las versiones humanizadas de este clon son las siguientes:

- 15 Región variable de la cadena ligera del clon F
- DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNIIDRYLNWYQQKLGEAPKRLLYNTNKLQTGIPSRFSGSGSATDFTL
TISSLQPEDFATYFCLQYNSLPLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 3)
- 20 Región variable de la cadena ligera 1 humanizada
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIIDRYLNWYQQKPGKAPKRLIYNTNKLQTGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYNSLPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 4)
- 25 Región variable de la cadena ligera 2 humanizada
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIIDRYLNWFQQKPGKAPKSLIYNTNKLQTGVPSKFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYNSLPLTFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 5)
- 30 Región variable de la cadena ligera 3 humanizada
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIIDRYLNWYQQKPGKAPKLLIYNTNKLQTGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYNSLPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)
- 35 Región variable de la cadena ligera 4 humanizada
- DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNIIDRYLNWYQQKPGKAPKLLIYNTNKLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYNSLPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 7)
- 40 Región variable de la cadena ligera 5 humanizada
- DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQNIIDRYLNWYQQKPGKAPKLLIYNTNKLQTGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPDDFATYYCLQYNSLPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)
- 45 Región variable de la cadena pesada del clon F
- EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSAASGFIFSEHNMAWVRQAPKKGLEWVATISDDGRNTYYRDSMRGRFTIS
RENARSTLYLQDSLRS EDTATYYCASHRYNLFDSWGQGMVTVSS (SEQ ID NO: 9)
- 50 Región variable de la cadena pesada 1 humanizada
- QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS AASGFIFSEHNMAWVRQAPGKGLEWVATISDDGRNTYYRDSMRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTSHRYNLFDSWGQGMTVTVSS (SEQ ID NO: 10)
- 55 Región variable de la cadena pesada 2 humanizada
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS AASGFIFSEHNMAWVRQAPGKGLEWVSTISDDGRNTYYRDSMRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHYNLFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
- 60 Región variable de la cadena pesada 3 humanizada
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS AASGFIFSEHNMAWVRQAPGKGLEWVATISDDGRNTYY
RDSMRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYNLFDSWGQGMTVTVSS (SEQ ID NO: 12)
- 65 Región variable de la cadena pesada 4 humanizada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSEHNMAWVRQAPGKGLVWVSTISDDGRNTYY
RDSMRGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRYNLFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)

5 Región variable de la cadena pesada 5 humanizada

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFIFSEHNMAWVRQAPGKGLEWVSTISDDGRNTYYR
DSMRGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKHRYNLFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 14)

- 10 Las tres secuencias de CDR en cada una de las regiones variables anteriores están subrayadas. Estas secuencias de CDR se han determinado basándose en la información sobre las regiones marco y las CDR de la base de datos IMGT (el sistema de información internacional ImMunoGeneTics) (véase www.imgt.org).

- 15 A continuación, se proporcionan más secuencias relacionadas con las anteriores y sus números identificadores de secuencia relevantes (SEQ ID NO):

Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
DIQMTQSPSFLSASVGDRVITINCKAS	Región marco 1 de cadena ligera de rata	15
QNIDRY	CDR1 de cadena ligera de rata	16
LNWYQQKLGEPKRLLY	Región marco 2 de cadena ligera de rata	17
NTN	CDR2 de cadena ligera de rata	18
KLQGTGPSRFSGSGSATDFTLTISLQPEDFATYFC	Región marco 3 de cadena ligera de rata	19
LQYNSLPLT	CDR3 de cadena ligera de rata	20
FGSGTKLEIK	Región marco 4 de cadena ligera de rata	21
EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSAAS	Región marco 1 de cadena pesada de rata	22
GFIFSEHN	CDR1 de cadena pesada de rata	23
MAWVRQAPKKGLEWVAT	Región marco 2 de cadena pesada de rata	24
ISDDGRNT	CDR2 de cadena pesada de rata	25
YYRDSMRGRFTISRDNARSTLYLQDSLRSSEDTATY YC	Región marco 3 de cadena pesada de rata	26
ASHRYNLFDS	CDR3 de cadena pesada de rata	27
WGQGVMTVSS	Región marco 4 de cadena pesada de rata	28
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS	Región FW 1 de cadena ligera humanizada 1	29
QNIDRY	CDR1 de cadena ligera humanizada 1	16
LNWYQQKPGKAPKRLIY	Región FW 2 de cadena ligera humanizada 1	30
NTN	CDR2 de cadena ligera humanizada 1	18
KLQGTGPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	Región FW 3 de cadena ligera humanizada 1	31
LQYNSLPLT	CDR3 de cadena ligera humanizada 1	20
FGQGTKLEIK	Región FW 4 de cadena ligera humanizada 1	32
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	Región FW 1 de cadena pesada humanizada 1	33
GFIFSEHN	CDR1 de cadena pesada humanizada 1	23
MAWVRQAPGKGLEWVAT	Región FW 2 de cadena pesada humanizada 1	34
ISDDGRNT	CDR2 de cadena pesada humanizada 1	25
YYRDSMRGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTS	Región FW 3 de cadena pesada humanizada 1	35

(continuación)

Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
TSHRYNLFDS	CDR3 de cadena pesada humanizada 1	36
WGQGTMTVSS	Región FW 4 de cadena pesada humanizada 1	37
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS	Región FW 1 de cadena ligera humanizada 2	29
QNIDRY	CDR1 de cadena ligera humanizada 2	16
LNWFQQKPGKAPKSLIY	Región FW 2 de cadena ligera humanizada 2	38
NTN	CDR2 de cadena ligera humanizada 2	18
KLQGTGVPKFSFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	Región FW 3 de cadena ligera humanizada 2	39
LQYNSLPLT	CDR3 de cadena ligera humanizada 2	20
FGQGTREIK	Región FW 4 de cadena ligera humanizada 2	40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	Región FW 1 de cadena pesada humanizada 2	41
GFIFSEHN	CDR1 de cadena pesada humanizada 2	23
MAWVRQAPGKGLEWVST	Región FW 2 de cadena pesada humanizada 2	42
ISDDGRNT	CDR2 de cadena pesada humanizada 2	25
YYRDSMRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAK	Región FW 3 de cadena pesada humanizada 2	43
AKHRYNLFDS	CDR3 de cadena pesada humanizada 2	44
WGQGTMTVSS	Región FW 4 de cadena pesada humanizada 2	45
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS	Región FW 1 de cadena ligera humanizada 3	29
QNIDRY	CDR1 de cadena ligera humanizada 3	16
LNWYQQKPGKAPKLLIY	Región FW 2 de cadena ligera humanizada 3	46
NTN	CDR2 de cadena ligera humanizada 3	18
KLQGTGVPKFSFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	Región FW 3 de cadena ligera humanizada 3	47
LQYNSLPLT	CDR3 de cadena ligera humanizada 3	20
FGQGTKLEIK	Región FW 4 de cadena ligera humanizada 3	32
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	Región FW 1 de cadena pesada humanizada 3	41
GFIFSEHN	CDR1 de cadena pesada humanizada 3	23
MAWVRQAPGKGLEWVAT	Región FW 2 de cadena pesada humanizada 3	34
ISDDGRNT	CDR2 de cadena pesada humanizada 3	25
YYRDSMRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR	Región FW 3 de cadena pesada humanizada 3	48
ARHRYNLFDS	CDR3 de cadena pesada humanizada 3	49
WGQGTMTVSS	Región FW 4 de cadena pesada humanizada 3	37

(continuación)

Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCKAS	Región FW 1 de cadena ligera humanizada 4	50
QNIDRY	CDR1 de cadena ligera humanizada 4	16
LNWYQQKPGKAPKLLIY	Región FW 2 de cadena ligera humanizada 4	46
NTN	CDR2 de cadena ligera humanizada 4	18
KLQGTGVPSPRFGSGSGTEFTL TISLQPEDF ATYYC	Región FW 3 de cadena ligera humanizada 4	31
LQYNSLPLT	CDR3 de cadena ligera humanizada 4	20
FGQGTKLEIK	Región FW 4 de cadena ligera humanizada 4	32
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	Región FW 1 de cadena pesada humanizada 4	41
GFIFSEHN	CDR1 de cadena pesada humanizada 4	23
MAWVRQAPGKGLVWVST	Región FW 2 de cadena pesada humanizada 4	51
ISDDGRNT	CDR2 de cadena pesada humanizada 4	25
YYRDSMRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR	Región FW 3 de cadena pesada humanizada 4	52
ARHRYNLFDS	CDR3 de cadena pesada humanizada 4	49
WGQGTLVTVSS	Región FW 4 de cadena pesada humanizada 4	45
DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCKAS	Región FW 1 de cadena ligera humanizada 5	53
QNIDRY	CDR1 de cadena ligera humanizada 5	16
LNWYQQKPGKAPKLLIY	Región FW 2 de cadena ligera humanizada 5	46
NTN	CDR2 de cadena ligera humanizada 5	18
KLQGTGVPSPRFGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC	Región FW 3 de cadena ligera humanizada 5	54
LQYNSLPLT	CDR3 de cadena ligera humanizada 5	20
FGQGTKLEIK	Región FW 4 de cadena ligera humanizada 5	32
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS	Región FW 1 de cadena pesada humanizada 5	55
GFIFSEHN	CDR1 de cadena pesada humanizada 5	23
MAWVRQAPGKGLEWVST	Región FW 2 de cadena pesada humanizada 5	42
ISDDGRNT	CDR2 de cadena pesada humanizada 5	25
YYRDSMRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAK	Región FW 3 de cadena pesada humanizada 5	56
AKHRYNLFDS	CDR3 de cadena pesada humanizada 5	44
WGQGTLVTVSS	Región FW 4 de cadena pesada humanizada 5	45
XXHRYNLFDS (donde X ₁ es A o T y X ₂ es S, K o R)	CDR3 de cadena pesada general	57

Un método alternativo para marcar CDR es usar el sistema de Kabat y esto puede dar resultados ligeramente diferentes. Sin embargo, puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. Para disipar cualquier duda, las secuencias de CDR en las regiones variables basadas en el sistema de Kabat son las siguientes, donde las CDR de

Kabat están en negrita:

Región variable de la cadena ligera del clon F

5 DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCK**KASQ****NIDRYL**NWYQQKLGEAPKRLLY**NTNKLQT**GVPSRFSGSGSATDFTL
LTISSLQPEDFATYFCL**QYNSLPL**TFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 3)

Región variable de la cadena ligera 1 humanizada

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK**KASQ****NIDRYL**NWYQQKPGKAPKRLIY**NTNKLQT**GVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCL**QYNSLPL**TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 4)

Región variable de la cadena ligera 2 humanizada

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK**KASQ****NIDRYL**NWFQQKPGKAPKSLIY**NTNKLQT**GVPSKFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCL**QYNSLPL**TFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 5)

Región variable de la cadena ligera 3 humanizada

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK**KASQ****NIDRYL**NWYQQKPGKAPKLLIY**NTNKLQT**GVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCL**QYNSLPL**TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)

Región variable de la cadena ligera 4 humanizada

25 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCK**KASQ****NIDRYL**NWYQQKPGKAPKLLIY**NTNKLQT**GVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCL**QYNSLPL**TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 7)

Región variable de la cadena ligera 5 humanizada

30 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCK**KASQ****NIDRYL**NWYQQKPGKAPKLLIY**NTNKLQT**GVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPDDFATYYCL**QYNSLPL**TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)

Región variable de la cadena pesada del clon F

35 EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSAASGFIF**SEHNMA**WVRQAPKKGLEWVATIS**DDGRNTYYRDSMRGRFTIS**
RENARSTLYLQLDSLSEDTATYYCASH**RYNLFDS**WGQGMVTVSS (SEQ ID NO: 9)

Región variable de la cadena pesada 1 humanizada

40 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSAAASGFIF**SEHNMA**WVRQAPGKGLEWVATIS**DDGRNTYYRDSMRGRFTIS**
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCT**SHRYNLFDS**WGQGMVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Región variable de la cadena pesada 2 humanizada

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFIF**SEHNMA**WVRQAPGKGLEWVSTIS**DDGRNTYYRDSMRGRFTIS**
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**HRYNLFDS**WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 11)

Región variable de la cadena pesada 3 humanizada

50 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFIF**SEHNMA**WVRQAPGKGLEWVATIS**DDGRNTYYRDSMRGRFTIS**
RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**HRYNLFDS**WGQGMVTVSS (SEQ ID NO: 12)

Región variable de la cadena pesada 4 humanizada

55 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFIF**SEHNMA**WVRQAPGKGLVWVSTIS**DDGRNTYYRDSMRGRFTIS**
RDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**HRYNLFDS**WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)

Región variable de la cadena pesada 5 humanizada

60 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSAAASGFIF**SEHNMA**WVRQAPGKGLEWVSTIS**DDGRNTYYRDSMRGRFTIS**
RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK**HRYNLFDS**WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 14)

Por lo tanto, las CDR cuando se determinan utilizando el sistema de Kabat son las siguientes:

Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
KASQNIDRYLN	CDR1 de la cadena ligera	58
NTNKLQT	CDR2 de la cadena ligera	59
LQYNSLPL T	CDR3 de la cadena ligera	20
EHNMA	CDR1 de la cadena pesada	60
TISDDGRNTYYRDSMRG	CDR2 de la cadena pesada	61
HRYNLFDS	CDR3 de la cadena pesada	62

Las secuencias ilustrativas para las regiones variables para la unión de CD3 son las siguientes con las CDR subrayadas:

5 Región variable de cadena ligera de ratón

QIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSL
TISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIN (SEQ ID NO: 63)

10 Región variable de la cadena ligera 1 humanizada

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQAPRLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLT
SSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 64)

15 Región variable de la cadena ligera 2 humanizada

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLPEDFATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 65)

20 Región variable de la cadena ligera 3 humanizada

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLT
SSLQPEDFATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 66)

25 Región variable de la cadena ligera 4 humanizada

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLT
SSLQPDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 67)

30 Región variable de la cadena ligera 5 humanizada

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCQQWSSNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 68)

35 Región variable de cadena pesada de ratón

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLT
TDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 69)

40 Región variable de la cadena pesada 1 humanizada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSRGYTNYNQKFKDRVTM
TRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 70)

45 Región variable de la cadena pesada 2 humanizada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQRLWGMGYINPSRGYTNYNQKFKDRVTIT
RDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 71)

50 Región variable de la cadena pesada 3 humanizada

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSRG

YTNYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGT MVTVSS (SEQ ID NO: 72)

Región variable de la cadena pesada 4 humanizada

5 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWIRQAPGKGLEWVSINPSRGYTNYNQKFKDRFTISR
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 73)

Región variable de la cadena pesada 5 humanizada

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWVSINPSRGYTNYNQKFKDRFTISR
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 74)

Secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico ROR1xCD3

15 QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSEHNMAWVRQAPGKGLEWVATISDDGRNTYYRDSMRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTSHRYNLFDSWGQGTMTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSP
SSLSASVGDRVTITCKASQNIIDRYLNWYQQKPGKAPKRLIYNTNKLQTVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPED
20 FATYYCLQYNSLPLTFGQGTKLEIKSGSGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTRYTMHWVR
QAPGQGLEWMGYINPSRGYTNYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED

Secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico ROR1xCD3 con una etiqueta de hexahistidina aminoterminal

25 QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSEHNMAWVRQAPGKGLEWVATISDDGRNTYYRDSMRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTSHRYNLFDSWGQGTMTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSP
30 SSLSASVGDRVTITCKASQNIIDRYLNWYQQKPGKAPKRLIYNTNKLQTVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYNSLPLTFGQGTKLEIKSGSGGGG
SQQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSRGYTNYNQKFKDRVT
ITADKSTSTAYMELSSLRSED

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> UCL Business PLC
<120> ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS PARA ROR1 Y CD3
<130> P532709PCTJW
45 <150> GB 1710838.2
<151> 05/07/2017
<160> 76
50 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 5
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Enlazador
60 <400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

ES 2 906 361 T3

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Enlazador
 10
 <400> 2
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 15
 <400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Arg Leu Leu
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asn Lys Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 20
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 25
 <210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera humanizada
 30
 <400> 4

ES 2 906 361 T3

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

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

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

Tyr Asn Thr Asn Lys Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera humanizada

<400> 5

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

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

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

Tyr Asn Thr Asn Lys Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

ES 2 906 361 T3

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera humanizada

<400> 6

10

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

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

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

Tyr Asn Thr Asn Lys Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

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

15

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera humanizada

20

<400> 7

ES 2 906 361 T3

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

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

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

Tyr Asn Thr Asn Lys Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 8

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región variable de cadena ligera humanizada

<400> 8

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

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

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

ES 2 906 361 T3

Tyr Asn Thr Asn Lys Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 9

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Glu His
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Asp Asp Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Met
50 55 60

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

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

Ala Ser His Arg Tyr Asn Leu Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Val Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 10

ES 2 906 361 T3

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

- 5 <210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada humanizada
 <400> 11

ES 2 906 361 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Glu His
20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Asp Asp Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Met
50 55 60

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

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

Ala Lys His Arg Tyr Asn Leu Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 12

ES 2 906 361 T3

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

<210> 13
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada humanizada
 <400> 13

ES 2 906 361 T3

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

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 14

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

ES 2 906 361 T3

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

Ala Lys His Arg Tyr Asn Leu Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 26
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 16

Gln Asn Ile Asp Arg Tyr
1 5

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 17

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Arg Leu Leu
1 5 10 15

Tyr

<210> 18
<211> 3
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 18

Asn Thr Asn
1

<210> 19

ES 2 906 361 T3

<211> 36
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <400> 19

Lys Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30

Thr Tyr Phe Cys
 35

10 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

15 <400> 20

Leu Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5

20 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 21

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

25

<210> 22
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

30

<400> 22

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

35

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

40

<400> 23

Gly Phe Ile Phe Ser Glu His Asn
 1 5

ES 2 906 361 T3

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 24

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

 Thr
 10
 <210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 25

 Ile Ser Asp Asp Gly Arg Asn Thr
 1 5
 20
 <210> 26
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 25 <400> 26

 Tyr Tyr Arg Asp Ser Met Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn
 1 5 10 15

 Ala Arg Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30

 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 35
 30
 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 27
 35
 Ala Ser His Arg Tyr Asn Leu Phe Asp Ser
 1 5 10

 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 28

ES 2 906 361 T3

		Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		1				5					10						
	<210>	29															
	<211>	26															
5	<212>	PRT															
	<213>	<i>Homo sapiens</i>															
	<400>	29															
		Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
		1				5					10				15		
		Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser						
10					20					25							
	<210>	30															
	<211>	17															
	<212>	PRT															
15	<213>	<i>Homo sapiens</i>															
	<400>	30															
		Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
		1				5					10				15		
		Tyr															
20																	
	<210>	31															
	<211>	36															
	<212>	PRT															
	<213>	<i>Homo sapiens</i>															
25																	
	<400>	31															
		Lys	Leu	Gln	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
		1				5					10				15		
		Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala
					20					25				30			
		Thr	Tyr	Tyr	Cys												
					35												
30																	
	<210>	32															
	<211>	10															
	<212>	PRT															
	<213>	<i>Homo sapiens</i>															
35																	
	<400>	32															
		Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
		1				5					10						
	<210>	33															
40	<211>	25															

ES 2 906 361 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 34

<211> 17

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

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

15

Thr

<210> 35

<211> 40

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Tyr Tyr Arg Asp Ser Met Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser
35 40

25

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada humanizada

<400> 36

35

Thr Ser His Arg Tyr Asn Leu Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 37

<211> 11

40

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 906 361 T3

<400> 37

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 <210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 38

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

15 <210> 39
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 39

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

25 <210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

30 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 41
<211> 25
<212> PRT
35 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

40

<210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 42

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

 Thr
 10 <210> 43
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 43

 Tyr Tyr Arg Asp Ser Met Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15

 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30

 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 35 40

 20 <210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada humanizada
 <400> 44

 Ala Lys His Arg Tyr Asn Leu Phe Asp Ser
 1 5 10
 30 <210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 45

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 40 <210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 46

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

Tyr

<210> 47
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 47

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 48
<211> 40
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 48

Tyr Tyr Arg Asp Ser Met Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada humanizada

<400> 49

Ala Arg His Arg Tyr Asn Leu Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 50
<211> 26
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 906 361 T3

<400> 50

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
20 25

5 <210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 51

Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser
1 5 10 15

Thr

15 <210> 52
<211> 40
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 52

Tyr Tyr Arg Asp Ser Met Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

25 <210> 53
<211> 26
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

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

30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
20 25

35 <210> 54
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

ES 2 906 361 T3

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

Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 55
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 55

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 56
<211> 40
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

Tyr Tyr Arg Asp Ser Met Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys
35 40

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser Ala o Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser Ser, Lys o Arg

<400> 57

ES 2 906 361 T3

		Xaa	Xaa	His	Arg	Tyr	Asn	Leu	Phe	Asp	Ser
		1				5					10

5 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 58

		Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asp	Arg	Tyr	Leu	Asn
		1				5					10	

15 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 59

		Asn	Thr	Asn	Lys	Leu	Gln	Thr
		1				5		

20 <210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 60

		Glu	His	Asn	Met	Ala
		1				5

30 <210> 61
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 61

		Thr	Ile	Ser	Asp	Asp	Gly	Arg	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Met	Arg
		1				5					10					15	

 Gly

40 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

45 <400> 62

		His	Arg	Tyr	Asn	Leu	Phe	Asp	Ser
		1				5			

 <210> 63

ES 2 906 361 T3

<211> 106
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 63

```

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20           25           30

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

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
          85           90           95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
          100          105
  
```

10 <210> 64
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera humanizada
 <400> 64

ES 2 906 361 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

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

<210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera humanizada

<400> 65

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

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

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

ES 2 906 361 T3

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

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

<210> 66
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera humanizada
<400> 66

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

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

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

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

<210> 67
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera humanizada
<400> 67

ES 2 906 361 T3

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

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

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

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

<210> 68

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región variable de cadena ligera humanizada

<400> 68

ES 2 906 361 T3

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

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

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

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

<210> 69

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 69

ES 2 906 361 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 70

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 70

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

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

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

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

ES 2 906 361 T3

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 71

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 71

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 906 361 T3

<220>

<223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 72

5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73

<211> 119

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada humanizada

15

<400> 73

ES 2 906 361 T3

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

<210> 74

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 74

ES 2 906 361 T3

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

<210> 75

<211> 490

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico ROR1xCD3

<400> 75

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

ES 2 906 361 T3

Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 245 250 255
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 260 265 270
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 275 280 285
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 290 295 300
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 305 310 315 320
 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 325 330 335
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
 340 345 350
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Val Glu
 355 360 365
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp
 370 375 380
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 385 390 395 400
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 405 410 415
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 420 425 430
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 435 440 445
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 450 455 460
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 465 470 475 480

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
485 490

<210> 76
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico ROR1xCD3 con una etiqueta de hexahistidina aminoterminal

<400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Glu His
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Asp Asp Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Met
50 55 60

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

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

Thr Ser His Arg Tyr Asn Leu Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
130 135 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
145 150 155 160

Ile Asp Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
165 170 175

Lys Arg Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Lys Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser
180 185 190

ES 2 906 361 T3

Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	195	200	205
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asn	210	215	220
Ser	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	225	230	235
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	245	250	255
Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	260	265	270
Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	275	280	285
Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	290	295	300
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	305	310	315
Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	325	330	335
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	340	345	350
Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Glu	355	360	365
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Asp	370	375	380
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	385	390	395
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	405	410	415
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	420	425	430
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	435	440	445

ES 2 906 361 T3

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
450 455 460

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
465 470 475 480

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His His His His His
485 490 495

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva al receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina cinasa (ROR1); y

un segundo dominio de unión a antígeno que se une de manera selectiva a la subunidad CD3 del receptor de linfocitos T (TCR);

en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en donde:

(a) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 9;

(b) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 10;

(c) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 11;

(d) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 12;

(e) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 13; o

(f) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 8 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 14.

2. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67 y 68, o una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la misma, y en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73 y 74, o una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la misma.

3. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en donde la molécula de anticuerpo comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 75 o 76, o una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma.

4. La molécula de anticuerpo de cualquier reivindicación anterior, en donde el primer dominio de unión a antígeno es un scFv.

5. La molécula de anticuerpo de cualquier reivindicación anterior, en donde el segundo dominio de unión a antígeno es un scFv.

6. La molécula de anticuerpo de cualquier reivindicación anterior, en donde los dominios de unión a antígeno primero y segundo son scFv unidos covalentemente por un enlazador peptídico.

7. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo es una IgG o una IgM, en donde opcionalmente el anticuerpo es una IgG₁ o una IgG₂.

8. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

9. Un ácido nucleico aislado que codifica la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, opcionalmente unido operativamente a un promotor.

10. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico aislado de la reivindicación 9.

11. Una célula hospedadora aislada que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9 o el vector de la reivindicación 10.

12. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de cáncer.

13. La molécula de anticuerpo para su uso según la reivindicación 12, en donde el cáncer es leucemia, cáncer de

páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, glioblastoma, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer suprarrenal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, neuroblastoma, sarcoma o cáncer renal.

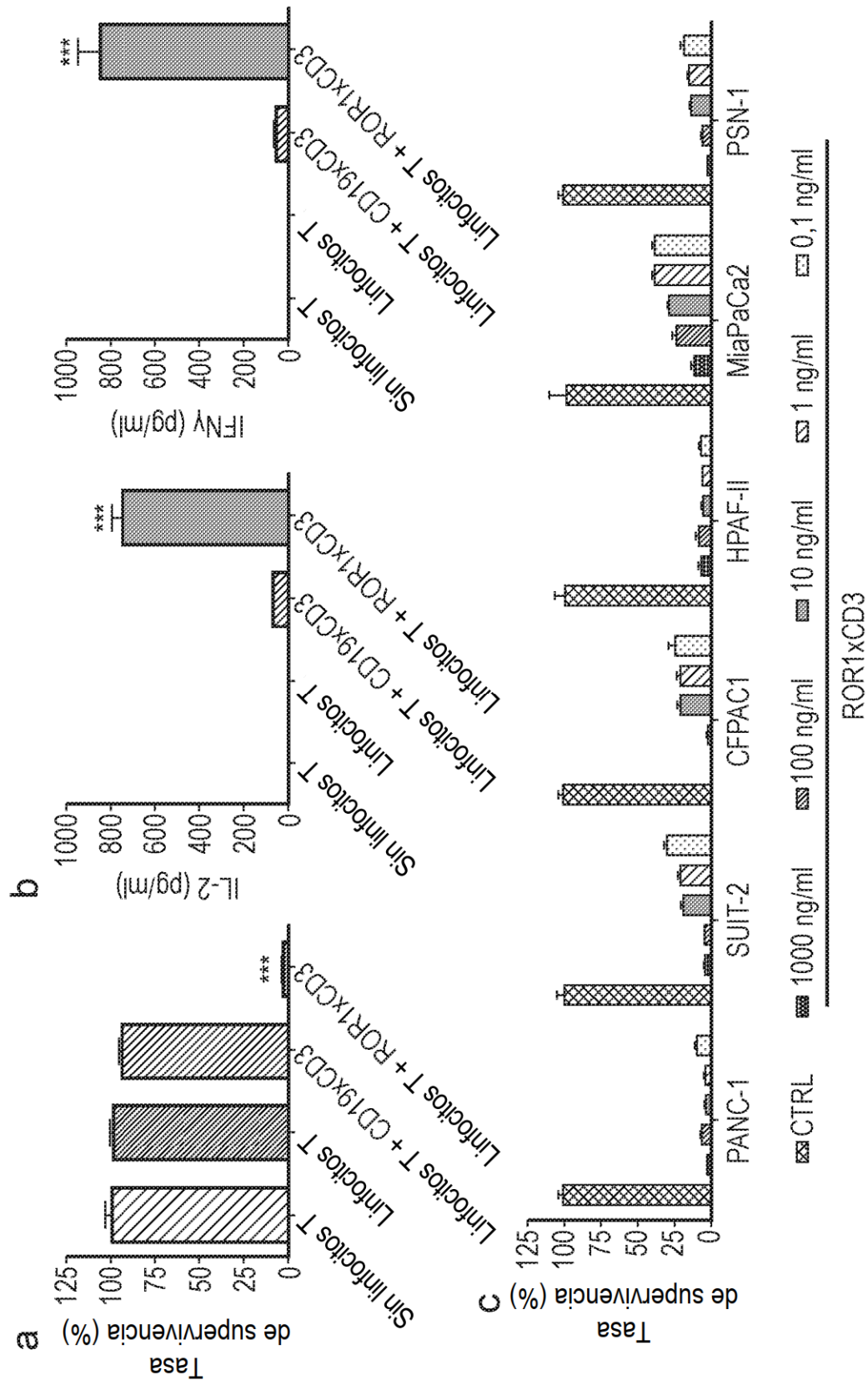


FIG. 1

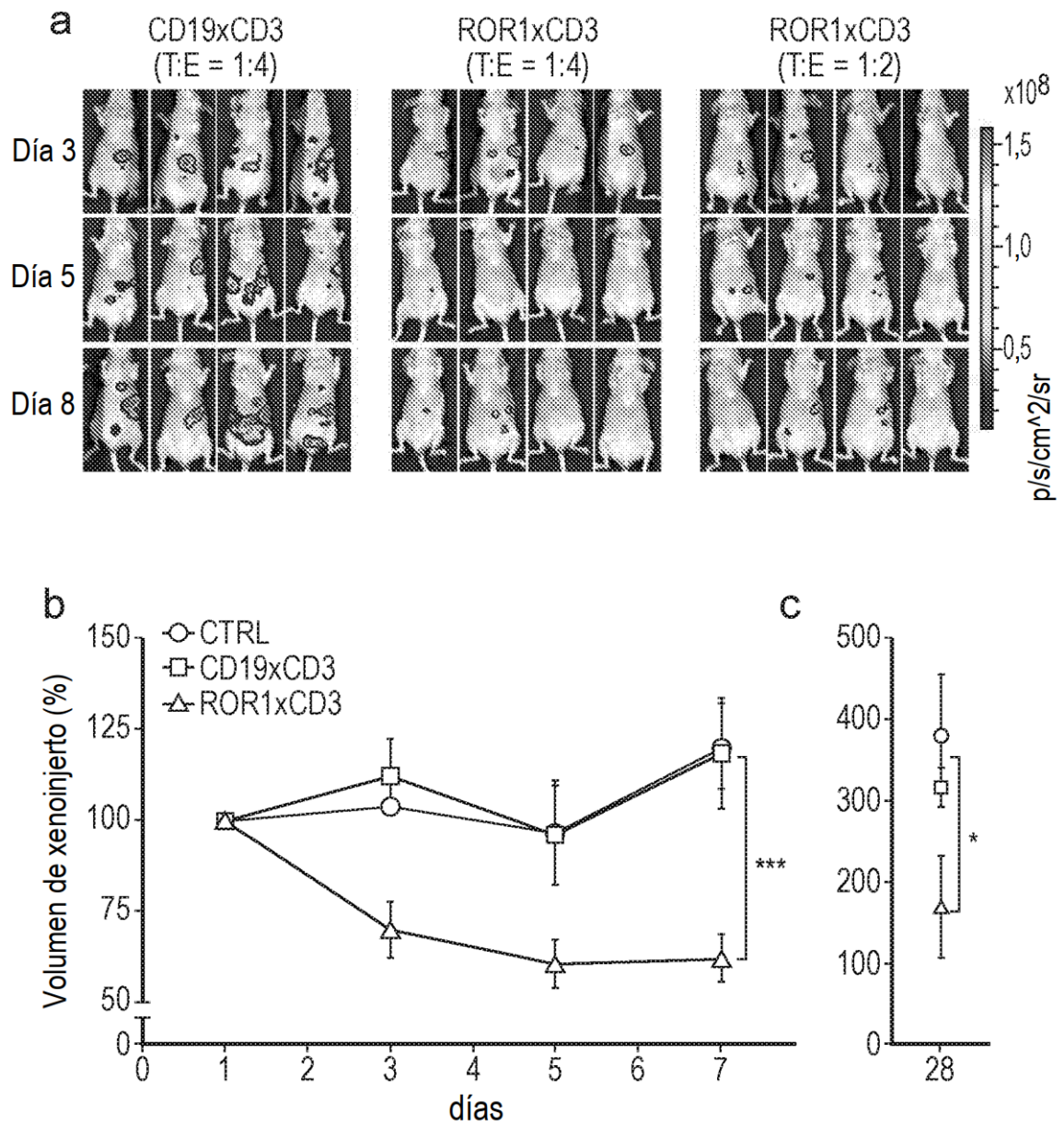


FIG. 2

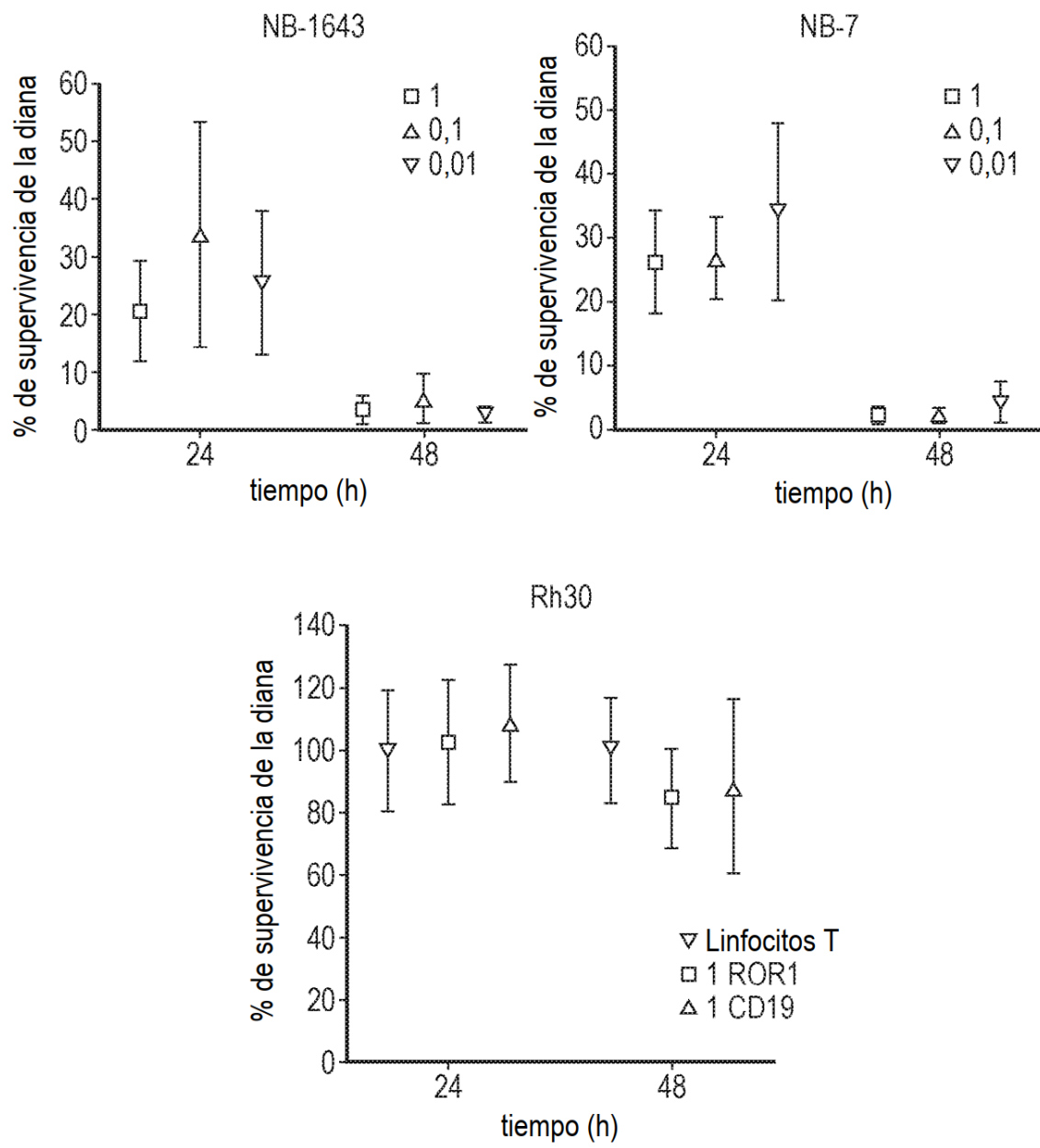


FIG. 3