



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 108699149 B

(45) 授权公告日 2023. 01. 06

(21) 申请号 201780009313.5

斯坦利·R·瑞德

(22) 申请日 2017.02.02

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108699149 A

专利代理师 张莹

(43) 申请公布日 2018.10.23

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据
62/290,337 2016.02.02 US
62/324,876 2016.04.19 US

(56) 对比文件
Amir H. DaneshManesh 等.Ror1, a cell
surface receptor tyrosine kinase is
expressed in chronic lymphocytic leukemia
and may serve as a putative target for
therapy.《Int. J. Cancer》.2008,第123卷第
1190-1195页.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.08.01

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/016300 2017.02.02

Jiahui Yang 等.Therapeutic Potential
and Challenges of Targeting Receptor
Tyrosine Kinase ROR1 with Monoclonal
Antibodies in B-Cell Malignancies.《PLOS
ONE》.2011,第6卷(第6期),第1-15页.

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/136607 EN 2017.08.10

(73) 专利权人 弗雷德哈钦森癌症中心
地址 美国华盛顿州

审查员 王炜晨

(72) 发明人 阿什维尼·巴拉克里什南
本杰明·G·霍夫斯特伦
朱莉·伦道夫-哈贝克

权利要求书5页 说明书32页
序列表19页 附图46页

(54) 发明名称

抗-ROR1抗体及其用途

(57) 摘要

本公开涉及抗-ROR1结合蛋白,包括结合
ROR1或其部分如ROR1蛋白的胞内C端部分的那
些,并且涉及此种结合蛋白在免疫组化和诊断方
法中的用途。还提供了使用所述结合蛋白的相关
试剂盒和方法,以及治疗被确定为此种通过本文
公开的结合蛋白或方法的治疗的候选人的患有
疾病或病症的受试者的方法。

1. 结合蛋白,所述结合蛋白包含与ROR1蛋白结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变结构域(VL)和重链可变结构域(VH),所述轻链可变结构域(VL)包含由SEQ ID NO:31所示序列组成的CDR1、由SEQ ID NO:33所示序列组成的CDR2和由SEQ ID NO:35所示序列组成的CDR3,所述重链可变结构域(VH)包含由SEQ ID NO:23所示序列组成的CDR1、由SEQ ID NO:27所示序列组成的CDR2和由SEQ ID NO:29所示序列组成的CDR3,根据kabat编号。

2. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述VL包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列,并且所述VH包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述VL包含SEQ ID NO:15所示的序列并且所述VH包含SEQ ID NO:12所示的序列。

4. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述VL包含SEQ ID NO:16所示的序列并且所述VH包含SEQ ID NO:12所示的序列。

5. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述VL包含SEQ ID NO:15所示的序列并且所述VH包含SEQ ID NO:13所示的序列。

6. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述VL包含SEQ ID NO:16中所示的序列并且所述VH包含SEQ ID NO:13所示的序列。

7. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述VL包含SEQ ID NO:15所示的序列并且所述VH包含SEQ ID NO:14所示的序列。

8. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述VL包含SEQ ID NO:16所示的序列并且所述VH包含SEQ ID NO:14所示的序列。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述ROR1蛋白是人ROR1蛋白。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合在SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列内的表位或包含SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列的表位。

11. 根据权利要求10所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白以 1×10^{-7} M或更小的 K_d 结合所述ROR1蛋白和/或所述表位。

12. 根据权利要求1-8中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含作为scFv的抗原-结合片段。

13. 根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白结合全长ROR1。

14. 根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白不结合ROR2。

15. 根据权利要求1-8中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白是包含抗原-结合结构域的融合蛋白。

16. 根据权利要求15所述的结合蛋白,其中所述融合蛋白的抗原-结合结构域是作为scFv的抗原-结合片段。

17. 根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白还包含标记。

18. 根据权利要求17所述的结合蛋白,其中所述标记是酶,染料,荧光标记,或蛋白标签。

19. 根据权利要求17所述的结合蛋白,其中所述标记是肽标签。

20. 根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白,其中:

(a) 所述结合蛋白与内源存在于生物样品的细胞中的ROR1蛋白的表位结合,所述生物样品包括来自受试者的组织切片或细胞,或

(b) 所述结合蛋白在参比抗体检测不到ROR1的内源表达的条件下检测到所述内源表达,所述参比抗体选自:多克隆ROR1抗体,识别ROR1的N端部分的ROR1抗体,ab135669,抗-人ROR1山羊多克隆抗体,抗-人ROR1兔多克隆抗体,抗-ROR1 4A5,和抗-人ROR1 2A2。

21. 根据权利要求20所述的结合蛋白,其中所述样品来源于肿瘤,所述肿瘤选自血液恶性肿瘤和实体瘤。

22. 根据权利要求21所述的结合蛋白,其中所述样品来源于:

(a) 选自CLL和MCL的血液恶性肿瘤,或

(b) 选自卵巢癌,肺癌,乳腺癌,和胰腺癌的实体瘤。

23. 根据权利要求22所述的结合蛋白,其中所述样品来源于:

选自肺腺癌、腺癌、鳞状细胞癌、小细胞癌和非典型类癌的肺癌;或
乳腺癌,所述乳腺癌为三阴性乳腺癌。

24. 根据权利要求20所述的结合蛋白,其中所述样品来源于正常组织,所述正常组织选自骨髓,脂肪组织,副甲状腺,食管,和胰腺。

25. 组合物,其包含根据权利要求1至24中任一项所述的结合蛋白和载体或赋形剂。

26. 多核苷酸,其编码根据权利要求1至24中任一项所述的结合蛋白。

27. 根据权利要求26所述的多核苷酸,其中针对含有所述多核苷酸的宿主细胞所述多核苷酸被密码子优化。

28. 表达构建体,其包含与表达控制序列可操作连接的根据权利要求26或27所述的多核苷酸。

29. 根据权利要求28所述的表达构建体,其中所述表达构建体存在于质粒中。

30. 根据权利要求28所述的表达构建体,其中所述表达构建体存在于病毒载体中。

31. 根据权利要求30所述的表达构建体,其中所述表达构建体存在于病毒载体中,所述病毒载体选自慢病毒载体或 γ -反转录病毒载体。

32. 宿主细胞,其包含根据权利要求26或27所述的多核苷酸,或根据权利要求28-31任一项所述的表达构建体。

33. 用于制备根据权利要求1至24中任一项所述的结合蛋白的方法,所述方法包括在适合表达所述结合蛋白的条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求26或27所述的多核苷酸或根据权利要求28-31中任一项所述的表达构建体,并且从培养物中分离所述结合蛋白。

34. 根据权利要求1-24任一项所述的结合蛋白或根据权利要求25所述的组合物在制备试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于通过检测所述结合蛋白与所述细胞的结合而鉴定表达全长ROR1的细胞。

35. 根据权利要求1-24任一项所述的结合蛋白或根据权利要求25所述的组合物在制备试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于通过检测所述结合蛋白与样品中的肽或表位的结合,或其缺乏,由此检测所述样品中ROR1蛋白或ROR1表位的存在或不存在。

36. 根据权利要求35所述的用途,其中将检测的结合的水平与参比水平比较,并且与参比水平相比增加的结合水平指示在所述样品中存在ROR1蛋白或ROR1表位。

37. 根据权利要求1-24任一项所述的结合蛋白或根据权利要求25所述的组合物在制备试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于通过检测所述结合蛋白与组织的特异结合而鉴定ROR1在组织样品中的存在。

38. 根据权利要求35-37中任一项所述的用途,其中所述样品获自受试者。

39. 根据权利要求35-37中任一项所述的用途,其中所述样品包含组织切片或细胞。

40. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品包含福尔马林固定的或冷冻的组织切片或经渗透化的细胞。

41. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品被福尔马林固定并被包埋在石蜡中,或所述样品被冷冻并被包埋在最适切割温度化合物中。

42. 根据权利要求35-37中任一项所述的用途,其中通过免疫组化或免疫印迹检测全长ROR1在所述细胞中的存在。

43. 根据权利要求35-37中任一项所述的用途,其中所述样品来源于受试者的肿瘤。

44. 根据权利要求43所述的用途,其中所述样品来源于:

(a) 选自CLL和MCL的血液恶性肿瘤,或

(b) 选自卵巢癌,肺癌,乳腺癌和胰腺癌的实体瘤。

45. 根据权利要求44所述的用途,其中所述样品来源于:

选自肺腺癌、腺癌、鳞状细胞癌、小细胞癌和非典型类癌的肺癌;或
乳腺癌,所述乳腺癌为三阴性乳腺癌。

46. 根据权利要求35-37中任一项所述的用途,其中所述样品来源于选自骨髓、脂肪组织、副甲状腺、食管和胰腺的正常组织。

47. 根据权利要求35-37中任一项所述的用途,其中所述ROR1是全长ROR1或细胞表面表达的ROR1。

48. 根据权利要求35-37中任一项所述的用途,其中,如果确定在所述样品或其与所述结合蛋白接触的部分中至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,或至少90%的细胞表达所述ROR1或表位,则所述受试者或样品被鉴定为利用抗-ROR1疗法的治疗的候选者。

49. 根据权利要求35-37中任一项所述的用途,其中,如果确定所述样品所来源的组织均一地或均质地表达所述ROR1或表位,则所述受试者或样品被鉴定为利用抗-ROR1疗法的治疗的候选者。

50. 根据权利要求49所述的用途,其中所述样品所来源的受试者将被施用抗-ROR1疗法。

51. 根据权利要求1-24中任一项所述的结合蛋白或根据权利要求25所述的组合物在制备试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于鉴定患有或处于患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病或病症的风险的受试者,包括将来自所述受试者的组织样品与所述结合蛋白或所述组合物接触,并且检测所述结合蛋白与所述组织的特异结合,由此鉴定患有或处于患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病或病症的风险的受试者。

52. 根据权利要求51所述的用途,其中所述与表达全长ROR1的细胞相关的疾病或病症是过度增殖疾病或病症。

53. 根据权利要求1-24任一项所述的结合蛋白或根据权利要求25所述的组合物在制备试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于鉴定患有过度增殖疾病或病症的受试者是否将受益

于ROR1特异性治疗,包括将来自所述受试者的组织样品与所述结合蛋白或所述组合物接触,并且检测所述结合蛋白与所述组织的特异结合,由此鉴定所述受试者是否将受益于ROR1特异性治疗。

54. 根据权利要求1-24任一项所述的结合蛋白或根据权利要求25所述的组合物在制备试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于确定患有与表达全长ROR1的细胞相关的过度增殖疾病或病症的受试者的预后,包括将来自所述受试者的组织样品与所述结合蛋白或所述组合物接触,并检测所述结合蛋白与所述组织的特异结合,其中检测特异结合将所述受试者鉴定为在不存在ROR1特异性治疗的情况下具有不良预后。

55. 根据权利要求52-54中任一项所述的用途,其中所述过度增殖疾病或病症是肿瘤。

56. 根据权利要求55所述的用途,其中所述肿瘤选自血液恶性肿瘤和实体瘤。

57. 根据权利要求56所述的用途,其中所述血液恶性肿瘤选自CLL和MCL。

58. 根据权利要求56所述的用途,其中所述实体瘤选自卵巢癌、肺癌、乳腺癌和胰腺癌。

59. 根据权利要求58所述的用途,其中所述实体瘤选自:

选自肺腺癌、腺癌、鳞状细胞癌、小细胞癌和非典型类癌的肺癌;或
乳腺癌,所述乳腺癌为三阴性乳腺癌。

60. 根据权利要求55所述的用途,其中所述肿瘤包括原发性肿瘤,转移肿瘤,或两者。

61. 根据权利要求51-54中任一项所述的用途,其中,如果在所述样品的组织中或其与
所述结合蛋白接触的部分中的细胞的组织的至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,或
至少90%的表面区域中检测到所述特异结合,或在所述组织中均一地或均质地观察到所述
特异结合,则所述受试者被鉴定为将受益于所述ROR1特异性治疗的受试者。

62. 根据权利要求51-54任一项所述的用途,其中检测特异结合将所述受试者鉴定为具
有肿瘤转移。

63. 根据权利要求51-54中任一项所述的用途,其中所述样品包括组织切片或细胞。

64. 根据权利要求63所述的用途,其中所述样品包括福尔马林固定的或冷冻的组织切
片或经渗透化的细胞。

65. 根据权利要求63所述的用途,其中所述样品被福尔马林固定并包埋在石蜡中,或者
样品被冷冻并包埋在最佳切割温度化合物中。

66. 根据权利要求51-54中任一项所述的用途,其中通过免疫组化或免疫印迹检测所述
结合蛋白与组织或样品的特异结合。

67. 根据权利要求51-54中任一项所述的用途,其中将抗-ROR1疗法施用于所鉴定的受
试者。

68. 根据权利要求67所述的用途,其中所述抗-ROR1疗法包括免疫疗法。

69. 根据权利要求68所述的用途,其中所述免疫疗法包括过继细胞疗法。

70. 根据权利要求68所述的用途,其中所述免疫疗法包含表达嵌合抗原受体的细胞,所
述嵌合抗原受体包含抗-ROR1抗体片段。

71. 根据权利要求70所述的用途,其中所述抗-ROR1抗体片段来源于命名为R12的抗体,
含有其抗原-结合区的抗体,或与命名为R12的抗体竞争结合。

72. 根据权利要求70所述的用途,其中所述细胞包括T细胞或NK细胞。

73. 试剂盒,其包含根据权利要求1至24中任一项所述的结合蛋白或根据权利要求25所

述的组合。

74. 根据权利要求73所述的试剂盒,其中所述试剂盒用于检测全长ROR1在组织样品中的存在。

75. 根据权利要求74所述的试剂盒,其中所述组织样品被福尔马林固定并被包埋在石蜡中,或所述组织样品被冷冻并被包埋在最适切割温度化合物中。

76. 根据权利要求74所述的试剂盒,其中通过免疫组化或免疫印迹检测全长ROR1在组织样品中的存在。

抗-ROR1抗体及其用途

[0001] 政府利益声明

[0002] 本发明利用美国 国立健康研究院给予的在CA114536和CA138293下的政府资助进行。美国 政府拥有本发明的某些权利。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式而非纸件提供,并且通过引用到申请文件中而结合于此。含有序列表的文本文件的名称为360056_437W0_SEQUENCE_LISTING。该文本文件为52.2KB,于2017年2月1日生成,并且经由EFS-Web电子提交。

[0005] 背景

[0006] 受体酪氨酸激酶ROR1是在多种肿瘤中过表达而极少在正常组织中过表达的癌胚胎抗原。ROR1在B-细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL),套细胞淋巴瘤 (MCL) 并且在一些上皮癌症中高度表达。人ROR1由基因Ror1编码,所述基因编码两个推定的剪接变体:定位于细胞表面的937个氨基酸的全长同种型 (ROR1_v1),和保持细胞内定位的主要含有全长ROR1的N 端部分的短的(截短的) 393个氨基酸的同种型 (ROR1_v2) (Hudecek等, Blood 116:4532, 2010)。

[0007] 基于ROR1在肿瘤细胞表面的高表达和正常组织中的最小ROR1表达,ROR1是利用治疗剂靶向的良好的肿瘤特异性或肿瘤相关性抗原。例如,表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞已被设计为靶向表达ROR1的肿瘤 (Hudecek等,Blood 116:4532-41,2010)。为了确定患者是否具有表达ROR1 的恶性肿瘤以及适合于ROR1特异性疗法,重要的是具有能够检测受试者细胞中的内源ROR1 (如在获自受试者的样品中的那些,例如表达在细胞表面上的ROR1形式,如在例如组织切片中的细胞表面表达的全长ROR1 分子) 表达的诊断试剂。

[0008] 免疫组化 (IHC) 是一种用于确定蛋白质在组织中存在与否的医学诊断中使用的常规技术。在其进行IHC分析前,肿瘤组织通常是福尔马林固定的和石蜡包埋的 (FFPE组织)。因此,ROR1诊断抗体应当能够检测组织样品中内源表达的ROR1。可商购的抗-ROR1抗体无法有效地检测FFPE组织中的内源ROR1。此外,大多数商业抗体靶向ROR1的N端部分并且不能检测全长ROR1和仅含全长ROR1的氨基端部分的短的ROR1同种型之间的差异。

[0009] 因此,仍然需要可用于检测和量化内源表达的ROR1的抗体。本公开满足了此种需要,并且还提供了其他相关优点。

[0010] 概述

[0011] 在某些方面,本公开涉及结合蛋白,所述结合蛋白特异性结合位于 ROR1的胞内蛋白激酶结构域的C端的ROR1的部分,其中所述结合蛋白任选地是免疫球蛋白样结合蛋白和/或是或包含抗体或其抗原-结合片段。

[0012] 在其他方面,本公开提供结合蛋白,所述结合蛋白特异性结合 (i) 包含SEQ ID NO.:3的肽,其中所述肽任选地由SEQ ID NO.:3组成,和/或 (ii) ROR1蛋白的表位,所述表位 (a) 在SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列内和/ 或 (b) 包含在SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列内的一个或多个氨基酸。

[0013] 在另外的其他方面,提供包含抗体或其片段的结合蛋白,所述抗体或其片段包含

与SEQ ID NO.:15或16所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的轻链可变结构域(V_L),以及SEQ ID NO.:12,13,或14所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的重链可变结构域(V_H),其中所述抗体任选地特异性结合(i)包含SEQ ID NO.:3的肽,其中所述肽任选地由SEQ ID NO.:3组成,和/或(ii)ROR1蛋白的表位,所述表位(a)在SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列内和/或(b)包含在SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列内的一个或多个氨基酸。

[0014] 在另外的其他方面,本公开提供结合蛋白,所述结合蛋白与参比结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白竞争与位于ROR1的胞内蛋白激酶结构域的C端的ROR1表位的特异结合。在一些实施方案中,本公开提供结合蛋白,所述结合蛋白与参比蛋白竞争与SEQ ID NO:3的肽的结合。

[0015] 在某些方面,本公开涉及组合物,所述组合物包含如本文所述的结合蛋白。

[0016] 在某些方面,本公开涉及多核苷酸,所述多核苷酸编码如本文所述的结合蛋白。

[0017] 在某些方面,本公开涉及表达构建体,所述表达构建体包含编码如本文所述的结合蛋白的多核苷酸。

[0018] 在某些其他方面,本公开涉及宿主细胞,所述宿主细胞包含如本文所述的表达构建体,或由如本文所述的表达构建体提供的多核苷酸。

[0019] 在某些其他方面,提供用于制备根据本公开所述的结合蛋白的方法,所述方法包括在适合于表达所述结合蛋白的条件下培养包含表达构建体或由表达构建体提供的多核苷酸的宿主细胞,并且任选地从培养物分离所述结合蛋白。

[0020] 在某些其他方面,提供用于鉴别表达全长ROR1的细胞的方法,所述方法包括将细胞与如本文公开的结合蛋白接触并检测所述结合蛋白与所述细胞的特异结合,由此鉴定表达全长ROR1的细胞。

[0021] 在某些其他方面,本公开提供检测方法,其包括(a)将生物样品与如本文公开的结合蛋白或组合物接触;以及(b)检测所述结合蛋白与所述样品中的肽或表位的特异结合,或其缺乏,其中所述方法由此检测在所述样品中ROR1或ROR1表位存在与否。

[0022] 在某些其他方面,本公开提供用于鉴定ROR1在组织样品中的存在的方法,所述方法包括将组织样品与如本文公开的结合蛋白接触并且检测所述结合蛋白与所述组织的特异结合,由此鉴定表达ROR1的组织,所述ROR1任选地是全长和/或细胞表面ROR1。

[0023] 在某些其他方面,提供用于鉴定患有或处于患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病的风险的受试者的方法,所述方法包括将来自所述受试者的组织样品与结合蛋白接触并检测所述结合蛋白与所述组织的特异结合,由此鉴定患有或处于患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病的风险的受试者。

[0024] 在某些其他方面,提供用于鉴定患有过度增殖疾病或病症的受试者是否将受益于ROR1特异性治疗的方法,所述方法包括将来自所述受试者的组织样品与如本文公开的结合蛋白接触并检测所述结合蛋白与所述组织的特异结合,由此鉴定所述受试者是否将受益于ROR1特异性治疗。

[0025] 在某些其他方面,提供用于鉴定患有过度增殖疾病或病症的受试者是否将受益于ROR1特异性治疗的方法,所述方法包括将来自所述受试者的组织样品与如本文公开的结合蛋白接触并检测所述结合蛋白与所述组织的特异结合,由此鉴定所述受试者是否将受益于ROR1特异性治疗。

[0026] 在某些其他方面,提供用于确定患有与表达全长ROR1的细胞相关的过度增殖疾病或病症的受试者的预后的方法,所述方法包括将来自所述受试者的组织样品与如本文公开的结合蛋白接触并检测所述结合蛋白与所述组织的特异结合,其中检测特异结合将所述受试者鉴定为在不存在 ROR1特异性治疗的情况下具有不良的预后。

[0027] 在某些其他方面,提供治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者施用抗-ROR1疗法,其中受试者中的疾病或病症的组织或样品已被鉴定为具有表面表达的ROR1的均一或均质的表达。在一些实施方案中,通过以上公开的方法进行所述确定。

[0028] 在另一方面,本公开提供试剂盒,所述试剂盒包含如本文公开的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白,或组合物。

[0029] 附图简述

[0030] 图1显示ROR1剪接变体的示意图。Ror1被表达为如下的两个剪接变体:定位于细胞表面的ROR1的全长937个氨基酸的同种型(本文中被称为“ROR1_v1”);以及仅包含ROR1_v1的胞外N端部分(即,缺少跨膜结构域和含有酪氨酸激酶结构域的胞内C端部分)并且因此不位于细胞膜的截短的393个氨基酸的剪接同种型(本文中被称为“ROR1_v2”)。

[0031] 图2显示通过实时PCR测量的来自正常人和恒河猴(rhesus macaque)的多个不同组织中全长Ror1转录本的表达水平。将来自两个不同供体并且已知表达高水平的ROR1的原发性慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞用作阳性对照(参见Hudecek等,Blood 116:4532, 2010)。

[0032] 图3A和3B显示通过免疫组化(IHC)测试可商购的和公布的抗-ROR1 抗体针对不同组织的结果。染色指示抗-ROR1抗体的结合。(A)在正常扁桃体组织(ROR1⁻),CLL和套细胞淋巴瘤(MCL)细胞(ROR1⁺,全长),K562 细胞(ROR1⁻),和被转染成过表达全长ROR1的K562细胞(ROR1⁺,全长)中测试可商购的和公布的抗-ROR1抗体的特异性结合ROR1的能力。(B)在ROR1转染的K562细胞,对照K562细胞,CLL淋巴结,和扁桃体组织上使用可商购的和之前公布的抗-ROR1抗体的IHC染色。

[0033] 图4显示在福尔马林固定的组织样品上抗-ROR1单克隆抗体2A2 (Biolegend, San Diego, CA)的ROR1结合减少。表达ROR1的ROR1⁺细胞(CLL和K562/ROR1细胞)用福尔马林过夜固定。显示与未固定的细胞相比,在福尔马林固定的ROR1⁺细胞中,通过使用抗-ROR1单克隆抗体2A2进行的流式细胞术分析的ROR1检测减少。通过免疫印迹显示,与CLL细胞的内源表达相比,被转染以过表达ROR1的K562细胞表达高得多的水平的ROR1蛋白。

[0034] 图5显示用于免疫小鼠的ROR1的C端部分中的肽(氨基酸404-937)的定位。图5显示的C端氨基酸序列(对于人和小鼠分别为SEQ ID NO.:51, SEQ ID NO.:53)仅存在于全长ROR1(ROR1_v1)中(例如,全长ROR1对应于SEQ ID NO.:1(人)或SEQ ID NO.:52(小鼠))。用于免疫小鼠以用于人 ROR1抗体制备的肽的定位和序列由框指示(对应于SEQ ID NOS.:2, 3, 54,和55)。

[0035] 图6A和6B显示用于制备与ROR1的C端部分结合的抗体的多克隆小鼠血清和杂交瘤克隆的筛选。(A)通过用以检测130kDa ROR1蛋白的免疫印迹分析针对ROR1⁻K562细胞和ROR1⁺CLL细胞溶胞产物筛选多个多克隆小鼠血清。(B)用于制备将能够仅结合CLL细胞中表达的全长ROR1 的抗体的通过免疫印迹分析筛选杂交瘤克隆的结果。通过CLL细胞溶胞产物中130kDa条带的存在检测产生抗-ROR1抗体的克隆。抗-ROR1单克隆抗体克隆6D4(箭头所指

的泳道)显示CLL细胞溶胞产物中强的130kDa 条带。克隆4A11也显示强的130kDa条带。

[0036] 图7显示通过IHC使用过表达全长ROR1的细胞(K562/ROR1⁺细胞) 和不表达ROR1的细胞(K562细胞,被称为ROR1⁻) 测试抗-ROR1单克隆抗体6D4的ROR1特异性的结果。抗体6D4显示在K562/ROR1⁺细胞中的过表达的全长ROR1的清楚的高细胞表面染色以及在K562细胞(ROR1⁻) 中的最小的背景染色。

[0037] 图8显示通过IHC在ROR1⁺(CLL和MCL淋巴结) 和ROR1⁻(扁桃体) 组织上测试抗-ROR1单克隆抗体6D4的结果。在CLL和MCL肿瘤淋巴结中抗体6D4显示内源全长ROR1的清楚的细胞表面染色,这在正常扁桃体组织中是检测不到的。

[0038] 图9A和9B显示与来源于其他克隆的单克隆抗体相比的对于单克隆抗体(mAb) 6D4的FFPE细胞的IHC染色。(A) 来自针对对照K562细胞, ROR1转染的K562细胞,和CLL淋巴结的浓缩的杂交瘤上清液的IHC筛选的代表性克隆。(B) 利用6D4 mAb的FFPE处理的CLL PBMC (n=2) 的成对IHC染色和利用抗-ROR1 mAb 2A2的流式细胞术染色。

[0039] 图10A至10C进一步显示通过mAb 6D4和同种型的FFPE细胞的IHC 染色,以及针对ROR1表达的细胞溶胞产物的免疫印迹分析。(A) 利用6D4 mAb的FFPE ROR1转染的和对照细胞系,和ROR1⁺肿瘤细胞系的IHC染色。比例尺表示50μm。利用抗-ROR1 6D4 mAb(实线),抗-ROR2(R&D Biosystems-FAB20641G)(虚线),和同种型(阴影灰)抗体的成对流式细胞术染色。(B) 相对于同种型的通过6D4 mAb的FFPE扁桃体组织和CLL和MCL淋巴结的染色。(C) 利用6D4 mAb的ROR1⁻和ROR1⁺细胞系的免疫印迹分析。全长ROR1表达为130kDa蛋白。

[0040] 图11显示ROR1⁺肿瘤的IHC评分的代表性图像。‘0分’ 指示没有染色。‘1分’ 指示低水平染色,膜染色在高放大率可见。‘2分’ 和‘3分’ 指示在低放大率可见的高度膜染色。

[0041] 图12显示如通过利用抗-ROR1单克隆抗体6D4的IHC分析的上皮癌中全长ROR1的表达。在卵巢癌,肺腺癌,和三阴性乳腺癌中观察到清楚的细胞表面染色。

[0042] 图13显示在肺癌亚型(腺癌,鳞状细胞癌,小细胞癌,和非典型类癌) 中通过抗体6D4检测到的ROR1表达。与利用同种型对照抗体的染色相比,利用该抗体在这些癌症类型中的每一种中观察到ROR1染色。

[0043] 图14显示在来源于正常活人组织的组织切片上使用抗体6D4和同种型对照的染色的结果。

[0044] 图15显示使用抗体6D4检测的在正常人组织的亚组(副甲状腺,食管,胰腺) 上ROR1的表达。

[0045] 图16A至16C显示在卵巢癌中使用6D4 mAb的膜ROR1染色。(A) 利用6D4 mAb染色的卵巢癌样品亚型的代表性IHC图像。比例尺表示 100μm。在底部图中将中间图中的方框中的区域放大了10X。(B) 卵巢癌的不同亚型中ROR1⁺肿瘤的百分比。(C) 在ROR1⁺卵巢癌亚组中ROR1^高和ROR1^低肿瘤的百分比。

[0046] 图17A至17C显示在乳腺癌中使用6D4 mAb的膜ROR1染色。(A) 利用6D4 mAb染色的乳腺癌组织样品的亚型的代表性IHC图像。比例尺表示100μm。在底部图中将中间图中的方框中的区域放大了10X。(B) 乳腺癌的不同亚型中ROR1⁺肿瘤的百分比。(C) ROR1⁺乳腺癌亚组中 ROR1^高和ROR1^低肿瘤的百分比。

[0047] 图18A至18D显示在肺癌中使用6D4 mAb的膜ROR1染色。(A) 利用6D4 mAb染色的肺癌样品的亚型中ROR1表达的代表性IHC图像。比例尺表示100μm。在底部图中将中间图中的

方框中的区域放大了10X。(B) 在肺癌的不同的亚型中ROR1⁺肿瘤的百分比。(C) 在ROR1⁺肺癌亚组中 ROR1^高和ROR1^低肿瘤的百分比。(D) 在ROR1⁺胰腺癌的原发性和匹配转移淋巴结中ROR1表达的代表性IHC图像。比例尺表示50 μ m。

[0048] 图19A和19B显示在胰腺癌中使用mAb 6D4的ROR1表达。(A) 在胰腺癌中ROR1染色的代表性IHC图像。比例尺表示100 μ m。最右侧的图是中间图的放大图像。(B) 胰腺癌中ROR1⁺肿瘤的百分比。

[0049] 图20A至20F显示通过利用mAb 6D4的IHC染色以及之后的免疫印迹验证指示的正常人组织中的ROR1表达。(A) 利用6D4 mAb的人副甲状腺和胰岛中的膜ROR1染色。比例尺表示100 μ m。在底部图中将中间图中的方框中的区域放大了10X。(B) 人胃肠道的不同区域中的ROR1表达。比例尺表示100 μ m。在底部图中将中间图中的方框中的区域放大了10X。(C) 正常人大脑,小脑,心脏,肺,脾和肝中不存在ROR1染色。比例尺表示100 μ m。(D) 利用6D4 mAb的正常组织中ROR1的免疫印迹分析。(E) 利用多克隆抗-ROR1的分析ROR1^高正常组织的免疫印迹。(F) 在正常组织中ROR1表达的免疫印迹验证,其中用PNGase F处理组织溶胞产物以除去N连接的糖基化。去糖基化的ROR1跑在100kDa。

[0050] 图21显示在CLL PBMC,分化的脂肪细胞,和正常人胃肠组织中Ror1 (编码全长ROR1,ROR1_v1)的转录本表达。

[0051] 图22A至22D显示ROR1-CAR T细胞活性和ROR1表达之间的关系。(A) 在以2:1的T细胞:靶标比与不同的靶细胞培养24小时后ROR1-CAR T 细胞或模拟转导的T细胞的细胞因子制备 (IFN- γ , GM-CSF, 和IL-2) (数据为2次独立实验的平均)。(B) 体外自前脂肪细胞分化的成熟脂肪细胞的利用6D4 mAb的ROR1染色。(C) 在以2:1的T细胞:靶标比与脂肪细胞,胰岛细胞或胰腺泡细胞培养24小时来自2个不同供体的ROR1-CAR T 细胞或模拟转导的T细胞的IFN- γ 制备。(D) 将ROR1-CAR T细胞或模拟转导的T细胞以5:1的T细胞:靶标比与CFSE标记的靶标孵育。在24小时后测量具有高水平碘化丙啶 (PI^高) 的靶细胞的细胞百分比。

[0052] 图23A至23D显示人和恒河猴ROR1之间的相似性并且显示mAb 6D4 与恒河猴ROR1的结合。(A) mAb 6D4识别的人 (SEQ ID NO.:3),小鼠 (SEQ ID NO.:57) 和恒河猴 (SEQ ID NO.:59) ROR1序列的比对。(B) 抗体6D4对恒河猴ROR1的结合。针对以下通过IHC测试抗体6D4: (A) K562 (ROR1⁻) 细胞和 (B) 表达恒河猴ROR1的K562细胞。还针对 (C) 恒河猴T细胞 (ROR1⁻) 和 (D) 转染有恒河猴ROR1的恒河猴T细胞测试抗体6D4。当在K562细胞或恒河猴T细胞中过表达时,抗体6D4显示全长恒河猴ROR1的清楚的细胞表面染色。(C) 恒河猴副甲状腺和胰岛中的ROR1染色。将中间图中的方框中的区域放大了10X。(D) 在恒河猴胃肠道的不同区域中 ROR1染色的代表性IHC图像。将中间图中的方框中的区域放大了10X。比例尺表示100 μ m。

[0053] 详述

[0054] 本公开提供对ROR1或其表位或来源于ROR-1的肽(如表面表达的,内源性的和/或全长ROR1)具有特异性(例如,与其特异性结合)的结合蛋白,如免疫球蛋白样结合蛋白,例如,抗体(包括其抗原-结合片段)。还提供编码所述结合蛋白的核酸,表达所述结合蛋白的宿主细胞,以及使用所述结合蛋白的方法。本文中提供的结合蛋白在一些方面特异性结合ROR1 的C端部分,并且因此可用于检测被发现定位于细胞表面上的ROR1的全长同种型的表达,并且在一些实施方案中,不结合通常定位于细胞内的缺少其C端部分的截短的ROR1同种

型。此外,免疫球蛋白样结合蛋白在一些方面可用于检测在例如福尔马林固定的-石蜡包埋的 (FFPE) 细胞或组织中的全长ROR1的表达,并且因此可用作诊断工具或作为ROR1治疗剂或方案的伴随诊断。例如,本文提供的免疫球蛋白样结合蛋白可用于确定受试者是否将受益于ROR1特异性疗法,是否应当施用,继续或调整此种疗法,和/或是否特定肿瘤类型应当被如此治疗。用于提供的任何实施方案的疗法的实例有免疫疗法,如抗体疗法和/或过继免疫疗法,和/或包含ROR1 特异性嵌合抗原受体 (CAR) 修饰的细胞 (例如,T细胞) 的那些。

[0055] 还提供治疗方法,如包括施用ROR1特异性疗法,如免疫疗法的那些。在某些实施方案中,疗法是或包含抗-ROR1抗体或其片段,如包含此种抗体片段的CAR。在另外的实施方案中,疗法是或包含CAR修饰的细胞,其中CAR特异性结合ROR1,如人ROR1的胞外部分。在一些实施方案中,CAR经由包含抗体片段 (如scFv) 的结合结构域结合ROR1。在一些方面,CAR还包含间隔区,如一个或多个抗体恒定区和/或铰链区;在一些方面,其还包含跨膜结构域以及一个或多个 (通常超过一个) 胞内信号转导结构域,如CD3zeta来源的或其他主要信号转导结构域和/或共刺激信号转导结构域,如来源于CD28和/或41BB的信号转导结构域。

[0056] 在一些实施方案中,CAR和/或抗体是,包含或共享表位特异性和/或与命名为R12的抗-ROR1 IgG1抗体 (其被例如以下公开:Yang等,PloS ONE,6:e21018,2011;Hudecek等,Clin.Cancer Res,19:3153,2013;美国专利申请号US 2013/0251642) 和/或其抗原-结合部分,如scFv,和/或含有其 CDR的抗体竞争结合。已证明含有R12的抗原-结合scFv片段的嵌合抗原受体 (CAR) 有效地促进CAR疗法中的抗肿瘤反应性 (Hudecek等,2013;国际PCT公布号WO 2014/031687)。

[0057] 在一些实施方案中,疾病或病症是或包括肿瘤,所述肿瘤可以是原发性或转移的。在一些方面,其是血液肿瘤,任选地是CLL或MCL,和/或 是实体瘤,任选地是乳腺癌,肺癌,卵巢癌,或胰腺癌肿瘤,任选地是肺腺癌,腺癌,鳞状细胞癌,小细胞癌,非典型类癌,或三阴性乳腺癌。在一些方面,在所述疾病或病症或与其相关的组织中至少50%,至少 60%,至少 70%,至少80%,或至少90%的细胞表达ROR1或其被所述疗法识别的表位或肽和/或此种蛋白或表位或肽在其中均一地或均质地表达。在一些方面,已经使用提供的抗体和/或与其一起使用的检测方法确定了此种表达。

[0058] 在详述本公开之前,有助于对其理解的是提供本文中所用的某些术语的定义。另外的定义被陈述于本公开的全文中。

[0059] 除非另外说明,在本说明书中,任何浓度范围,百分比范围,比率范围,或整数范围被理解为包括所述范围内的任意整数值,并且合适时,包括其分数 (如整数的十分之一和百分之一)。此外,除非另外说明,本文中述及的涉及任何物理特征,如聚合物亚基,大小或厚度的任何数目范围被理解为包括所述范围内的任意整数。

[0060] 除非另外说明,当在本文中使用时,术语“约”表示指定范围,值或结构的 $\pm 20\%$ 。

[0061] 应当理解本文中使用的术语“一个”和“一种”是指“一个或多个”所列举的组分。备选方案的使用 (例如,“或”) 应当被理解为是指备选项中的一个,两个或其任意组合。

[0062] 此外,应当理解衍生自本文中所述的结构和取代基的多种组合的个体化合物或化合物的组被本申请公开至与单独陈述各化合物或化合物的组相同的程度。因此,选择特定的结构或特定的取代基在本公开的范围。

[0063] 当在本文中使用时,术语“包括”,“具有”和“包含”被同义使用,所述术语及其变体

意在被视为是非限制性的。

[0064] 术语“基本上由……组成”将权利要求的范围限制到特定的材料或步骤,或限制到不实质影响本发明的基本特征的那些。例如,当结构域,区域,组件,或蛋白的氨基酸序列所包括的延长,缺失,突变,或其组合(例如,氨基端或羧基端或结构域之间的氨基酸)合并起来占所述结构域,区域,组件,或蛋白的长度的最多20%(例如,最多15%,10%,8%,6%,5%,4%,3%,2%或1%)并且基本上不影响(即,减小的活性不超过50%,如不超过40%,30%,25%,20%,15%,10%,5%,或1%)所述结构域,区域,组件,或蛋白的活性(例如,结合蛋白的靶结合亲和性)时,蛋白结构域,区域或组件(例如,结合结构域,铰链区,接头组件)或蛋白(其可以具有一个或多个结构域,区域,或组件)“基本上由”特定的氨基酸序列”组成”。

[0065] 当在本文中使用时,“ROR1”或“受体酪氨酸激酶样孤儿受体1”是与 UniProtKB No. Q01973-1, Q01973-2或Q01973-3中任一的人参比氨基酸序列,或参比氨基酸序列的共有序列,或其同种型或变体或片段具有同源性的哺乳动物受体酪氨酸激酶多肽。示例性同源物是UniProtKB No. Q9Z139-1的小鼠氨基酸序列。在其全长形式中,ROR1包含(1)胞外部分,其含有免疫球蛋白样结构域,Frizzled结构域和Kringle结构域;(2)跨膜部分;以及(3)胞内部分,其含有酪氨酸激酶结构域(图1),本文中被称为“全长ROR1”或“ROR1_v1”。在某些实施方案中,全长ROR1是人全长ROR1,例如,包含SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。也发现了作为胞内同种型的ROR1,其包含全长ROR1的N端部分,并且缺少全长ROR1的跨膜和胞内部分(Hudecek等,Blood 116:4532,2010),本文中被称为“截短的ROR1”或“短的同种型ROR1”或“ROR1_v2”。

[0066] 当在本文中使用时,术语“多肽”是指由通过肽键连接的氨基酸残基组成的化合物。术语“蛋白质”可以与术语“多肽”含义相同或还可以指两个以上多肽的复合物。多肽还可以含有其他组件(例如,共价键),如标签,标记,生物活性分子,或其任意组合。在某些实施方案中,多肽可以是片段。当在本文中使用时,“片段”表示缺少在参比序列中发现的一个或多个氨基酸的多肽。片段可以包含在参比序列中发现的结合结构域,抗原,或表位。参比多肽的片段可以具有参比序列的氨基酸序列的至少约20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%以上的氨基酸。

[0067] 如本文中所述的,“变体”多肽种类相对于本文中呈现的参比多肽在一个或多个位点具有一个或多个非天然氨基酸,一个或多个氨基酸置换,一个或多个氨基酸插入,一个或多个氨基酸缺失,或其任意组合。在某些实施方案中,“变体”表示相对于参比多肽具有基本上类似的活性(例如,酶功能,免疫原性)或结构的多肽。如通过序列比对程序和本领域中已知的参数确定的,参比多肽的变体与参比多肽的氨基酸序列可以具有至少约40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%以上的序列同一性。变体可产生自例如遗传多形性 or 人操纵。氨基酸的保守置换是已知的并且可以天然发生或可以在重组制备蛋白质时引入。氨基酸置换,缺失和添加可以使用本领域中已知的诱变方法引入蛋白中(参见,例如,Sambrook等,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001)。寡核苷酸引导的位点特异性(或区段特异性)诱变方法可用于提供具有根据所需的

置换,缺失或插入而改变的特定密码子的改变的多核苷酸。备选地,随机或饱和诱变技术,如丙氨酸扫描诱变,易错聚合酶链反应诱变,和寡核苷酸引导的诱变可用于制备多肽变体(参见,例如, Sambrook等,同上)。

[0068] 在两个以上多肽或核酸分子序列的语境中,术语“相同”或“百分比同一性”表示,当在比较窗或指定区域比较和比对最大一致性时,相同的或在指定区域上具有特定百分比(例如,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%同一性)的相同的氨基酸残基或核苷酸的两个以上序列或子序列,如使用本领域中已知的方法(如序列比较算法,通过手工比对,或通过视觉观察)测量的。例如,适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的优选算法有 BLAST和BLAST 2.0算法,其分别被描述于Altschul等(Nucleic Acids Res. 25:3389,1977)和Altschul等(J.Mol.Biol.215:403,1990)。

[0069] 当在本文中使用时,“融合蛋白”包含具有两个不同结构域的单链多肽,其中所述结构域并不天然地一起存在于蛋白中。编码融合蛋白的核酸分子可以使用PCR(重组改造的,等等)来构建,或此种融合蛋白可以合成制备。融合蛋白还可以含有其他组件(例如,共价结合的),如标签或生物活性分子。

[0070] “核酸分子”或“多核苷酸”是指单链或双链线形或环状多核苷酸,其含有通过3'-5'-磷酸二酯键连接的脱氧核糖核酸或核糖核酸。核酸分子包括 RNA,DNA,基因组DNA,线粒体DNA,cDNA,或载体DNA。

[0071] 还预期的是本公开的多核苷酸的变体。变体多核苷酸与如本文中所述的参比多核苷酸具有至少80%,85%,90%,95%,99%,或99.9%同一性,或在0.015M氯化钠,0.0015M柠檬酸钠,约65°-68℃或0.015M氯化钠,0.0015M柠檬酸钠,和50%甲酰胺,约42℃的严格杂交条件下与限定序列的参比多核苷酸杂交。多核苷酸变体保持编码具有本文所述功能性的免疫球蛋白样结合蛋白或其抗原-结合片段的能力。

[0072] 术语“分离的”是指材料离开其原本的环境(例如,如果其是天然存在的,则为天然环境)。例如,存在于活的动物中的天然存在的多核苷酸或多肽不是分离的,而自自然系统中共存的材料中的一些或全部分离的相同的多核苷酸或多肽是分离的。此种多核苷酸可以是载体的部分和/或此种多核苷酸或多肽可以是组合物(例如,细胞溶胞产物)的部分,并且仍然是分离的,因为此种载体或组合物不是核酸或多肽的天然环境的部分。

[0073] 在将核酸序列插入到细胞中的语境中,术语“引入”表示“转染”或“转化”或“转导”并且包括提及将核酸序列结合到真核或原核细胞中,其中所述核酸分子可以被整合到细胞基因组中(例如,染色体,质粒,质体或线粒体 DNA),转化为自复制子,或瞬时表达(例如,转染的mRNA)。

[0074] 当在本文中使用时,“异源”或“外源”核酸分子,构建体或序列是指这样的核酸分子或核酸分子的部分,其对于宿主细胞来说是非天然的,但是可以与来自宿主细胞的核酸分子或核酸分子的部分是同源的。异源或外源核酸分子,构建体或序列的来源可以是来自不同的属或种。在某些实施方案中,通过例如缀合,转化,转染,电穿孔等将异源或外源核酸分子添加(即,非内源或天然的)至宿主细胞或宿主基因组,其中添加的分子可以整合到宿主基因组中或作为染色体外遗传物质存在(例如,作为质粒或其他形式的自复制载体),并且可以存在于多个拷贝中。此外,“异源”是指由引入到宿主细胞中的外源核酸分子编码的

非天然酶,蛋白或其他活性,即使宿主细胞编码同源蛋白或活性。

[0075] 当在本文中使用时,术语“内源”或“天然”是指正常存在于宿主细胞中的基因,蛋白或活性。此外,与亲本基因,蛋白或活性相比突变,过表达,重排,复制或以其他方式改变的基因,蛋白或活性对于特定宿主细胞仍被认为是内源的或天然的。例如,来自第一基因的内源控制序列(例如,启动子,翻译衰减序列)可用于改变或调节第二天然基因或核酸分子的表达,其中第二天然基因或核酸分子的表达或调节不同于亲本细胞中的正常表达或调节。

[0076] “免疫组化”(IHC)是指用于检测组织学样品(如细胞和组织样品)中抗原的存在的技术,其使用对抗原具有特异性的抗体。细胞或组织样品可以是获自受试者或生物来源的任何组织或细胞。“受试者”或“生物来源”可以是,例如,人或非人动物,原代细胞,细胞培养物或培养适应的细胞系,包括可以含有染色体整合的或附加体重组或异源核酸分子的遗传改造的细胞系,体细胞杂交细胞系,永生化或可永生化细胞或细胞系,分化的或可分化的细胞或细胞系,转化的细胞或细胞系,等等。在某些实施方案中,生物样品来自人。“人患者”意在表示患有或处于与ROR1,如全长ROR1 的表达或过表达相关的任何疾病或病症的发展或复发的风险中的人受试者。

[0077] “免疫印迹”或“免疫印迹”(也被称为蛋白印迹)表示用于检测组织匀浆或提取物的样品中抗原(例如,ROR1)的存在的技术,其使用凝胶电泳来分离蛋白并利用对抗原具有特异性的抗体或其片段或变体将分离的蛋白染色。

[0078] 对ROR1特异的结合蛋白

[0079] 提供结合蛋白,如ROR1结合蛋白,其通常特异性结合ROR1蛋白和 /或其部分。所述结合蛋白包括结合结构域并且本文公开的结合蛋白在一些实施方案中特异性检测全长ROR1,因为其结合ROR1的C端部分,所述 C端部分存在于全长ROR1同种型中而不存在于截短的ROR1同种型中。相反,大多数可商购的和公开的抗-ROR1抗体是针对ROR1的N端部分,所述N端部分存在于全长ROR1 (ROR1_v1) 和截短的ROR1 (ROR1_v2) 两种形式中。因此,本公开的免疫球蛋白结合结构域和免疫球蛋白样蛋白可用于以高的特异性程度鉴定表达(例如,内源)全长ROR1的细胞和组织。

[0080] 此外,本公开的免疫球蛋白结合结构域和蛋白能够检测由例如癌细胞内源表达的全长ROR1。此外,本文公开的免疫球蛋白样结合蛋白可用于检测组织学样品中(如福尔马林固定的石蜡包埋的 (FFPE) 组织样品中) 全长 ROR1的内源表达。通过比较,可商购的和公布的抗-ROR1抗体不一致地结合,弱地检测,或通常无法检测组织学样品中内源表达的ROR1。例如,此种商品抗体无法检测已被固定在福尔马林中并被包埋在石蜡中的组织学样品中的内源ROR1表达。因此,与已知的抗-ROR1抗体相比,本文公开的免疫球蛋白结合结构域和蛋白在检测内源表达的ROR1方面(除了更大的特异性以外) 还显示更大的灵敏度。

[0081] 当在本文中使用时,“结合结构域”或“结合区”是指有能力特异性识别和结合靶标(例如,抗原,配体)的蛋白,多肽,寡肽,或肽(例如,抗体,受体)或其部分。结合结构域包括任何天然存在的,合成的,半合成的或重组制备的生物分子或其他感兴趣的靶标的结合配偶体。示例的结合结构域包括免疫球蛋白轻链和重链可变区(例如,结构域抗体,sFv,单链Fv片段 (scFv),Fab,F(ab')₂),受体胞外域或配体。免疫球蛋白可变结构域(例如,scFv,Fab)在本文中被称为“免疫球蛋白结合结构域”。已知多种测定用于鉴定特异性结合特定靶

标的本公开的结合结构域,包括蛋白印迹,ELISA 和Biacore[®] 分析。

[0082] 在某些实施方案中,结合结构域是较大的多肽或蛋白的部分并且因此被称为“结合蛋白”。“免疫球蛋白结合蛋白”或“免疫球蛋白样结合蛋白”是指含有一个或多个免疫球蛋白结合结构域的多肽,其中所述多肽的形式可以为多种免疫球蛋白相关蛋白支架或结构中任一,如抗体或其抗原结合片段,scFv-Fc融合蛋白,或包含两个以上此种免疫球蛋白结合结构域或其他结合结构域的融合蛋白。

[0083] 结合指定结构域“C端”的结合结构域或蛋白是指结合位于指定结构域内或相对于指定结构域更接近蛋白的C末端的表位的结合结构域或蛋白。例如,结合“ROR1的胞内蛋白激酶结构域的C端”是指结合位于胞内蛋白激酶结构域内,位置邻近(接近或在约10至约15个氨基酸内)并且相对于胞内蛋白激酶结构域更接近ROR1的C末端,或定位在ROR1的C末端和胞内蛋白激酶结构域之间的ROR1的部分。

[0084] 在某些方面,本公开提供结合蛋白,所述结合蛋白特异性结合ROR1 的C端部分。在一些实施方案中,结合蛋白特异性结合ROR1的胞内蛋白激酶结构域的C端。在特别的实施方案中,结合蛋白是免疫球蛋白样结合蛋白。在另外的实施方案中,结合蛋白是或包含抗体或其抗原结合片段。在任一前述实施方案中,ROR1可以是人ROR1。例如,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段,如6D4或其抗原结合片段,如包含SEQ ID NO:37和/或38所示的序列的抗体或其抗原结合片段,或包含其一个或多个CDR或与此种抗体竞争结合ROR1或 ROR1肽的抗体。

[0085] 术语“表位”包括能够特异结合免疫球蛋白,受体或其他结合结构域或结合蛋白的任何氨基酸序列或蛋白决定簇。表位决定簇通常包含具有化学活性的分子(如氨基酸或糖侧链)的表面簇集,并且可以具有特异性三维结构特征,以及特异性电荷特征。

[0086] 在某些实施方案中,本公开的免疫球蛋白样结合蛋白可以特异性结合位于与SEQ ID NO.:2,3,4,5,54,或55所示的氨基酸序列具有至少 90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少 96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.5%,或100%同一性的氨基酸序列内的表位。在另外的实施方案中,本公开的免疫球蛋白样结合蛋白可以特异性结合位于与SEQ ID NO.:2,3,54,或55所示的氨基酸序列具有至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少 95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.5%,或100%同一性的氨基酸序列内的表位。在另外的实施方案中,本公开的免疫球蛋白样结合蛋白特异性结合位于氨基酸序列 N-NPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIP-C (SEQ ID NO.:3) 内的表位。

[0087] 在某些实施方案中,本公开的结合蛋白特异性结合(i) 包含SEQ ID NO.:3的肽,其中所述肽任选地由SEQ ID NO.:3组成,和/或(ii) ROR1蛋白的表位,所述表位(a) 在SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列内和/或(b) 包含在SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列内的一个或多个氨基酸。

[0088] 在具体的实施方案中,本公开的结合蛋白结合位于与SEQ ID NO.:3 所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列内的表位。

[0089] 结合结构域的来源包括来自多个物种的抗体可变区(其可以被制成抗体,sFv, scFv,Fab或可溶V_H结构域或结构域抗体),所述多个物种包括人,啮齿动物,鸟,野兔和绵羊。结合结构域的其他来源包括来自其他物种的抗体的可变区,所述物种如骆驼科(来自骆

驼,单峰骆驼或羊驼; Ghahroudi等,FEBS Letters 414:521,1997;Vincke等, J.Biol.Chem.284: 3273,2009;Hamers-Casterman等,Nature 363:446,1993和Nguyen 等, J.Mol.Biol.275:413,1998), 较口鲨(Roux等,Proc.Nat'l.Acad.Sci. (USA) 95:11804, 1998),科氏兔银鲛(spotted ratfish)(Nguyen等, Immunogenetics 54:39,2002),或七鳃鳗(Herrin等,Proc.Nat'l.Acad.Sci. (USA) 105:2040,2008和Alder等,Nature Immunol.9:319,2008)。这些抗体显然可以仅使用重链可变区形成抗原-结合区,即,这些功能抗体是仅有重链的同源二聚体(被称为“重链抗体”)(Jespers等,Nature Biotechnol. 22:1161,2004;Cortez-Retamozo等,Cancer Res.64:2853,2004;Baral 等,Nature Med.12:580,2006;以及Barthelemy等,J.Biol.Chem.283: 3639,2008)。

[0090] 抗体技术领域的技术人员理解的术语各自给出了在本领域中获得的含义,除非在本文中明确地不同地定义。术语“抗体”表示包含通过二硫键互联的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的完整抗体,以及具有或保持结合由完整抗体所识别的抗原靶分子的能力的完整抗体的任何抗原-结合部分或片段,如scFv,Fab或Fab' 2片段。因此,术语“抗体”在本文中以最广义使用并且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体及其功能(抗原结合) 抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段,F(ab')₂片段,Fab'片段,Fv片段,重组IgG(rIgG)片段,单链抗体片段,包括单链可变片段(scFv),和单结构域抗体(例如,sdAb,sdFv,纳米抗体)片段。该术语包括遗传改造的和/或以其他方式修饰的免疫球蛋白的形式,如细胞内抗体,肽抗体(peptibody),嵌合抗体,完全人抗体,人源化抗体和异源缀合物抗体,多特异性,例如,双特异性,抗体,双抗体(diabody),三抗体(triobody)和四抗体(tetrabody),串联二-scFv,串联三-scFv。除非另外说明,术语“抗体”应当被理解为涵盖其功能抗体片段。该术语还涵盖完整的或全长抗体,包括任一类型或亚类的抗体,包括IgG及其亚类,IgM,IgE,IgA和IgD。

[0091] 单克隆抗体或其抗原-结合部分可以是非人,嵌合,人源化,或人。免疫球蛋白结构和功能综述在,例如,Harlow等人,编.,Antibodies:A Laboratory Manual,第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,1988)。

[0092] 例如,术语“V_L”和“V_H”表示分别来自抗体轻链和重链的可变结合区域。所述可变结合区域由被称作“互补性决定区”(CDR)和“框架区”(FR)的不连续的、明确限定的亚区域构成。术语“CL”表示“免疫球蛋白轻链恒定区”或“轻链恒定区”,即,来自抗体轻链的恒定区。术语“CH”表示“免疫球蛋白重链恒定区”或“重链恒定区”,其可以根据抗体同种型进一步分成CH1、CH2和CH3(IgA、IgD、IgG)或CH1、CH2、CH3和CH4结构域(IgE、IgM)。“Fab”(抗原结合片段)是抗体结合抗原的部分,且包括可变区和通过链间二硫键连接至轻链的重链的CH1。

[0093] 本领域中已知与“高变区”或“HVR”同义的术语“互补决定区”和“CDR”是指抗体可变区内的非连续氨基酸序列,其给予抗原特异性和/或结合亲和力。通常,每个重链可变区中存在三个CDR(CDR-H1,CDR-H2,CDR-H3)并且在轻链可变区中存在三个CDR(CDR-L1,CDR-L2,CDR-L3)。本领域中已知“框架区”和“FR”是指重链和轻链的可变区的非CDR部分。通常,每个全长重链可变区中存在四个FR(FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4),并且在每个全长轻链可变区中存在四个FR(FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4)。

[0094] 可以使用多种已知方案中的任一种来容易地确定给定的CDR或FR 的准确的氨基酸序列边界,所述方法包括以下描述的方案:Kabat等,“Sequences of Proteins of

Immunological Interest,” (5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991) (“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等(J.Mol.Biol.273:927-948,1997) (“Chothia”编号方案), MacCallum等(J.Mol.Biol.262:732-745,1996) (“Contact”编号方案), Lefranc MP等(Dev.Comp.Immunol.7:55-77,2003) (“IMGT”编号方案)和 Honegger A和Plückthun A(J.Mol.Biol.309:657-70,2001) (“Aho”编号方案)。

[0095] 给定CDR或FR的边界可以根据用于鉴定的方案而不同。例如,Kabat 方案是基于结构比对,而Chothia方案是基于结构信息.Kabat和Chothia 方案的编号都是基于最常见的抗体区序列长度,其中在一些抗体中出现由插入字母(例如,“30a”)调节的插入以及缺失。两个方案将某些插入和缺失 (“indel”)置于不同位置,导致不同的编号.Contact方案是基于复合物晶体结构的分析并且在很多方面类似于Chothia编号方案。

[0096] 下表1列出了分别由Kabat,Chothia和Contact方案鉴定的CDR-L1, CDR-L2,CDR-L3和CDR-H1,CDR-H2,CDR-H3的示例位置边界。对于CDR-H1,残基编号使用Kabat和Chothia编号方案两者列出.FR位于 CDR之间,例如,FR-L1位于CDR-L1和CDR-L2之间,以此类推。要注意的是,因为所示的Kabat编号方案将插入放置在H35A和H35B处,所以当使用所示的Kabat编号规定进行编号时,Chothia CDR-H1环的末端在 H32和H34之间变化,这取决于环长度。

[0097] 表1.示例CDR位置边界

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L96
[0098] CDR-H1 (Kabat 编号 ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia 编号 ²)	H31--H35	H26--H32	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0099] 1-Kabat等,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Ed. Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991.

[0100] 2-Al-Lazikani等,J.Mol.Biol.273:927-948,1997.

[0101] 因此,除非另外指出,给定抗体或其区域(如其可变区)的“CDR”或“互补决定区”或单独指定的CDR(例如,CDR-H1,CDR-H2)应当被理解为包括一个(或特定的)由以上任意方案限定的互补决定区。例如,当表述为特定CDR(例如,CDR-H3)包含给定 V_H 或 V_L 氨基酸序列中的相应CDR的氨基酸序列时,要理解的是此种CDR具有如以上任一方案所限定的可变区内的相应CDR(例如,CDR-H3)的序列。在一些实施方案中,指定的CDR 序列是被指定的。同样,除非

另外说明,给定抗体或其区域(如其可变区)的FR或单独指定的FR(例如,FR-H1,FR-H2)应当被理解为包括一个(或特定的)由以上任意方案限定的框架区。在一些情况中,用于鉴定一个具体的CDR,FR或多个FR或多个CDR的方案被指定,如通过Kabat,Chothia 或Contact方法限定的CDR。在其他情况中,给出CDR或FR的具体氨基酸序列。

[0102] 提供的抗体中有抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,所述分子包含完整抗体的部分,完整抗体的所述部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv,Fab,Fab',Fab'-SH,F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在特别的实施方案中,抗体是单链抗体片段,其包含可变重链区,可变轻链区或两者,如scFv。

[0103] 单结构域抗体是这样的抗体片段,其包含抗体的重链可变结构域的全部或部分或抗体的轻链可变结构域的全部或部分。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。

[0104] 抗体片段可以通过多种技术制备,如,例如,完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞的制备。在一些实施方案中,所述抗体是重组制备的片段,如包含非天然存在的布置的片段,如具有通过合成的接头(例如,肽接头)连接的两个以上抗体区域或链的片段,和/或其可以不是通过天然存在的抗体的酶消化制备的。在一些方面,所述抗体片段是scFv。

[0105] 本文中使用的“Fc区部分”表示来自抗体的Fc片段(“可结晶片段”区或Fc区)的重链恒定区区段,其可以包括一个或多个恒定结构域,如CH₂、CH₃、CH₄或它们的任意组合。在某些实施方案中,Fc区部分包括IgG、IgA或IgD抗体的CH₂和CH₃结构域或它们的任意组合,或IgM或IgE抗体的CH₃和CH₄结构域和它们的任意组合。在其它实施方案中,CH₂CH₃或CH₃CH₄结构具有来自相同抗体同种型的亚区域结构域,且是人的,如人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM(例如,来自人IgG1的CH₂CH₃)。作为背景,Fc区负责免疫球蛋白的效应子功能,如ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)、CDC(补体依赖性的细胞毒性)和补体结合,结合Fc受体(例如,CD16、CD32、FcRn),相对于缺少Fc区的多肽的更大的体内半衰期,蛋白A结合,且可能甚至是胎盘转移(参见Capon等人,Nature 337:525,1989)。在某些实施方案中,在本公开的免疫球蛋白样结合蛋白中发现的Fc区部分能够介导这些效应子功能中的一种或多种,或通过例如本领域已知的一种或多种突变而缺少这些活性中的一种或多种或全部。

[0106] 另外,抗体具有典型地位于Fab和Fc区之间的铰链序列(但是铰链的下段可以包括Fc区的氨基端部分)。作为背景,免疫球蛋白铰链充当柔性间隔区以允许Fab部分在空间上自由移动。不同于恒定区,铰链具有结构多样性,在免疫球蛋白种类之间和甚至亚类之间序列和长度有所不同。例如,人IgG1铰链区是自由柔性的,其允许Fab片段围绕对称轴旋转和在两个重链间二硫键中的第一个为中心的球体内移动。通过对比,人IgG2铰链是相对短的,且含有被四个重链间二硫键稳定化的刚性聚脯氨酸双螺旋,其限制柔性。人IgG3铰链与其它亚类的差别在于它的独特的伸长的铰链区(是IgG1铰链的长度的约4倍),其含有62个氨基酸(包括21个脯氨酸和11个半胱氨酸),从而形成不可弯曲的聚脯氨酸双螺旋,并提供更大的柔性,因为Fab片段相对远离Fc片段。人IgG4铰链比IgG1更短,但是具有与IgG2相同的长度,且它的柔性介于IgG1和IgG2之间。

[0107] 当在本文中使用时,除非另外提供,人IgG1重链恒定区中的氨基酸残基的位置这样编号:假设人IgG1的可变区由根据Kabat编号规定的128个氨基酸残基组成。然后将人IgG1重链的编号的恒定区用作其他免疫球蛋白重链恒定区中氨基酸残基编号的参照。不同于人IgG1重链的免疫球蛋白重链的恒定区中目的氨基酸残基的位置是与目的氨基酸残基比对的人IgG1重链中的氨基酸残基的位置。人IgG1重链和其他免疫球蛋白重链的恒定区之间的比对可以使用本领域中已知的软件程序进行,如使用 Clustal W方法以及默认参数的 Megalign程序(DNASTAR Inc.)。根据本文所述的编号系统,例如,虽然人IgG2 C_{H2}区与其他C_{H2}区相比可以在邻近其氨基末端处具有氨基酸缺失,位于人IgG2 C_{H2}中的296处的“N”的位置仍被认为是位置297,因为该残基与人IgG1 C_{H2}中的位置297处的“N”对齐。

[0108] 在一些实施方案中,免疫球蛋白样结合蛋白是抗体或其抗原-结合片段。例如,结合蛋白包含抗体,并且所述抗体是单克隆抗体或其抗原-结合片段。在某些实施方案中,免疫球蛋白样结合蛋白是单克隆抗体6D4或其抗原-结合片段。

[0109] 在某些实施方案中,本公开的结合蛋白,例如,抗体或其结合片段,包含重链或其部分,所述重链或其部分包含SEQ ID NOS.:6,7和8所示的序列。在一些实施方案中,重链或其部分包含SEQ ID NOS.:21,25和29;和/或22,26和29;和/或23,27和29;和/或24,28和30所示的氨基酸序列(例如,CDR序列)。在一些实施方案中,重链或其部分包含SEQ ID NO.:37或与其具有至少90,95,96,97,98,或99%同一性的序列,和/或包含与SEQ ID NO.:12,13或14所示的序列具有至少90,95,96,97,98,或99%同一性或100%同一性的序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO.:8,29或30的序列和SEQ ID NO.:11,35或36的序列。在某些实施方案中,结合蛋白,例如,抗体或其片段,包含轻链或其部分,所述轻链或其部分包含SEQ ID NO.:9,10和11所示的序列。在一些实施方案中,轻链或其部分包含SEQ ID NO.:31,33和35;和/或32,34和36所示的氨基酸序列(例如,CDR序列)。在一些实施方案中,轻链或其部分包含SEQ ID NO.:38或与其具有至少90,95,96,97,98,或99%同一性的序列,和/或包含与SEQ ID NO.:15或16所示的序列具有至少90,95,96,97,98,或99%同一性或100%同一性的序列。在一些实施方案中重链或其部分是或包含V_H并且在一些实施方案中轻链或其部分是或包含V_L。

[0110] 在某些实施方案中,结合蛋白包含(a)SEQ ID NO.:6所示的重链 CDR1氨基酸序列,或具有1或2个氨基酸置换的SEQ ID NO.:6的变体;(b)SEQ ID NO.:7所示的重链CDR2氨基酸序列,或具有1或2个氨基酸置换的SEQ ID NO.:7的变体;和(c)SEQ ID NO.:8所示的重链CDR3氨基酸序列,或具有1或2个氨基酸置换的SEQ ID NO.:8的变体。在其他实施方案中,本公开的免疫球蛋白样结合蛋白包含(a)SEQ ID NO.:9所示的轻链CDR1氨基酸序列,或具有1或2个氨基酸置换的SEQ ID NO.:9的变体;(b)SEQ ID NO.:10所示的轻链CDR2氨基酸序列,或具有1或2个氨基酸置换的SEQ ID NO.:10的变体;和(c)SEQ ID NO.:11所示的轻链CDR3氨基酸序列,或具有1或2个氨基酸置换的SEQ ID NO.:11的变体。在另外的实施方案中,本公开的免疫球蛋白样结合蛋白,如抗体或其抗原结合片段,包含与SEQ ID NO.:15或16所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的轻链可变结构域(V_L),和与SEQ ID NO.:12,13,或14所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的重链可变结构域(V_H)。在任一前述实施方案中,免疫球蛋白样结合蛋白是抗体或其抗原结合片段,如单克隆抗体或改造的单克隆抗体或其结合片段。

[0111] 在某些实施方案中,本文公开的结合蛋白包含(i)重链CDR3,其具有在SEQ ID NO.:12,13,或14所示的重链可变结构域(V_H)序列内的CDR3的氨基酸序列;和/或(ii)轻链CDR3,其具有SEQ ID NO.:15或16所示的轻链可变结构域(V_L)序列内的CDR3的氨基酸序列。在另外的实施方案中,重链CDR3包含SEQ ID NO.:29或SEQ ID NO.:30所示的序列并且/或轻链CDR3包含SEQ ID NO.:35或SEQ ID NO.:36所示的序列。在此种实施方案中,结合蛋白还可以包含分别具有在SEQ ID NO.:12,13,或14所示的重链可变结构域(V_H)序列内的CDR1和/或CDR2的氨基酸序列的重链CDR1和/或重链CDR2;和/或(ii)具有在SEQ ID NO.:15或16所示的轻链可变结构域(V_L)序列内的CDR3的氨基酸序列的轻链CDR1和/或轻链CDR2。在特别的实施方案中,重链CDR1包含SEQ ID NO.:21,22,23,或24所示的序列,和/或重链CDR2包含SEQ ID NO.:25,26,27,或28所示的序列;和/或轻链CDR1包含SEQ ID NO.:31或32所示的序列,并且轻链CDR2包含SEQ ID NO.:33或34所示的序列。

[0112] 在某些实施方案中,本公开的结合蛋白包含与SEQ ID NO.:15或16所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的轻链可变结构域(V_L),和与SEQ ID NO.:12,13,或14所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的重链可变结构域(V_H);和/或其中结合蛋白含有包含SEQ ID NO.:37的 V_H 和/或包含SEQ ID NO.:38的 V_L 。

[0113] 在某些其他实施方案中,结合蛋白包含抗体的抗原结合片段,如scFv(通过短的肽接头连接的重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L))。例如,本公开的免疫球蛋白样结合蛋白包含scFv,所述scFv具有与SEQ ID NO.:15或16所示的氨基酸序列具有至少90%同一性或包含SEQ ID NO.:38的序列的轻链可变结构域(V_L),和与所SEQ ID NO.:12,13,或14所示的氨基酸序列具有至少90%同一性或包含SEQ ID NO.:37的序列或与其具有至少95,96,97,98,或99%同一性的序列的重链可变结构域(V_H)。在某些实施方案中,scFv包含 V_H 和 V_L ,所述 V_H 具有SEQ ID NO.:12,13或14所示的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO.:37的序列,或与其具有至少95,96,97,98,或99%同一性的序列,所述 V_L 具有SEQ ID NO.:15或16所示的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO.:38的序列,或与其具有至少95,96,97,98,或99%同一性的序列。在特别的实施方案中,本公开的结合蛋白包含scFv,所述scFv具有单克隆抗体6D4或其结合片段的可变结构域 V_L 和 V_H 。

[0114] 在另外的实施方案中,本公开的结合蛋白包含抗体或其片段,所述抗体或其片段包含与SEQ ID NO.:15或16所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的轻链可变结构域(V_L),和与SEQ ID NO.:12,13,或14所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的重链可变结构域(V_H),其中所述抗体任选地特异性结合(i)包含SEQ ID NO.:3的肽,其中所述肽任选地由SEQ ID NO.:3组成,和/或(ii)ROR1蛋白的表位,所述表位(a)在SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列内和/或(b)包含在SEQ ID NO.:3所示的氨基酸序列内的一个或多个氨基酸。

[0115] 在另外的实施方案中,本公开的结合蛋白不结合ROR2。

[0116] 当在本文中使用时,在一些实施方案中,"特异性结合"或"具有特异性"可以是指结合蛋白(例如,抗-ROR1抗体)或结合结构域(或其融合蛋白)与靶分子以等于或大于 $10^5 M^{-1}$ 的亲合力或 K_a (即,特定结合相互作用的平衡结合常数,单位为1/M,其等于该结合反应的结合速率 $[k_{on}]$ 与解离速率 $[k_{off}]$ 之比)结合或联合,而不与样品中的任何其他分子或组分显著结合或联合。结合结构域(或其融合蛋白)可以被分类为"高亲合力"结合结构域(或其融合蛋白)和"低亲合力"结合结构域(或其融合蛋白)。“高亲合力”结合结构域是指 K_a 为至少

10^8M^{-1} ,至少 10^9M^{-1} ,至少 10^{10}M^{-1} ,至少 10^{11}M^{-1} ,至少 10^{12}M^{-1} ,或至少 10^{13}M^{-1} ,优选至少 10^8M^{-1} 或至少 10^9M^{-1} 的那些结合结构域。”低亲和力”结合结构域是指 K_d 为高达 10^8M^{-1} ,高达 10^7M^{-1} ,高达 10^6M^{-1} ,高达 10^5M^{-1} 的那些结合结构域。备选地,亲和力可以被定义为特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d),其单位为M(例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M)。

[0117] 已知多种测定用于鉴定特异性结合具体靶标的本公开的结合结构域,以及确定结合结构域或融合蛋白亲和力,如蛋白印迹,ELISA,分析型超速离心,光谱学和表面等离子共振(Biacore®)分析(参见,例如,Scatchard 等,Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660,1949;Wilson, Science 295:2103,2002; Wolff等,CancerRes.53:2560,1993;和美国专利号5,283,173, 5,468,614,或对等物)。

[0118] 在某些实施方案中,任一前述结合蛋白以高亲和力结合ROR1,如人 ROR1。例如,与人ROR1具有高亲和力的免疫球蛋白样结合蛋白以 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更小的 K_d 结合。

[0119] 在任一前述实施方案中,结合蛋白可以结合人ROR1,并且在一些方面不结合或不特异性结合另一物种的ROR1,如鼠ROR1和/或结合又一物种的ROR1,如恒河猴。

[0120] 在另外的实施方案中,本公开提供结合蛋白(例如,免疫球蛋白样结合蛋白,抗体或其抗原-结合片段,或融合结合蛋白),其用于与参比结合蛋白(例如,免疫球蛋白样结合蛋白,抗体或其抗原-结合片段,或融合结合蛋白)竞争对位于ROR1的胞内蛋白激酶结构域的C端的ROR1表位的特异结合。当在竞争相同表位的免疫球蛋白样结合蛋白或抗体或其结合片段的语境中使用,术语”竞争”表示通过测定确定的免疫球蛋白样结合蛋白之间的竞争,在所述测定中受试免疫球蛋白结合蛋白或抗体或其结合片段阻止或抑制参比免疫球蛋白样结合蛋白或抗体或其结合片段与ROR1表位的特异结合。例如,结合由抗体6D4或其结合片段所识别的相同表位或重叠表位的测试抗体将能够竞争与靶蛋白(ROR1)或其含有所述表位的片段的结合。竞争性结合测定是本领域中已知的,并且包括放射性免疫测定(RIA),竞争性酶免疫测定(EIA)和夹心竞争测定。在一些实施方案中,本公开的结合蛋白与本文公开的参比蛋白竞争与ROR1和/或SEQ ID NO:3 的肽的结合,和/或结合与本文公开的参比蛋白相同或重叠的ROR1表位。在一些实施方案中,参比结合蛋白包含SEQ ID NO.:6所示的重链CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO.:7所示的重链CDR2氨基酸序列,SEQ ID NO.:8 所示的重链CDR3氨基酸序列,SEQ ID NO.:9所示的轻链CDR1氨基酸序列,SEQ ID NO.:10所示的轻链CDR2氨基酸序列,和SEQ ID NO.:11所示的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方案中,免疫球蛋白样结合蛋白与参比免疫球蛋白结合蛋白竞争对位于ROR1的胞内蛋白激酶结构域的C端的ROR1表位的特异结合,其中所述参比结合蛋白包含与SEQ ID NO.:15 或16所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的轻链可变结构域(V_L),和与SEQ ID NO.:12,13,或14所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的重链可变结构域(V_H)。在一些实施方案中,参比结合蛋白包含与SEQ ID NO.:15,16,或38所示的氨基酸序列具有至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.5%,或100%同一性的轻链可变结构域(V_L),和与SEQ ID NO.:12,13,14,或37所示的氨基酸序列具有至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.5%,或100%同一性的重链可变结构域(V_H)。在特别的实施方案中,参比结合蛋白包含单克隆抗体6D4或其结合片段。

[0121] 在更多的实施方案中,结合蛋白,参比结合蛋白或两者各自独立地是抗体或其抗

原-结合片段。例如，结合蛋白，参比结合蛋白，或两者可以包含抗体，所述抗体可以是单克隆抗体。在特别的实施方案中，例如，参比结合蛋白是单克隆抗体6D4。在一些实施方案中，结合蛋白，参比结合蛋白，或两者可以各自独立地包含嵌合或人源化抗体。在另外的实施方案中，结合蛋白，参比结合蛋白，或两者包含抗体的抗原-结合片段，并且所述抗原-结合片段是scFv。在另外的实施方案中，结合蛋白，参比结合蛋白，或两者是融合蛋白，所述融合蛋白包含抗原-结合结构域（例如，来自单克隆抗体6D4的scFv），其中所述抗原是ROR1，如哺乳动物或人ROR1。在某些实施方案中，融合蛋白的抗原-结合结构域是抗体的抗原-结合片段。例如，融合蛋白可以包含抗体的抗原-结合片段，其中所述抗原-结合片段是对ROR1（如哺乳动物或人ROR1）具有特异性的scFv。

[0122] 在一些实施方案中，如本文公开的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白还包含标记，如酶，染料，荧光标记，DNA条形码（例如，长度为5至75个核苷酸），或标签。当在本文中使用，“肽标签”或“蛋白标签”是指独特的肽序列，其被固定，融合至目的蛋白，或是目的蛋白的部分并且被异源或非内源的同源结合分子特异性结合，所述结合性质可用于检测，鉴定，分离或纯化，追踪，富集，或靶向带标签的肽或蛋白或表达带标签的肽或蛋白的细胞，特别是当带标签的肽或蛋白是蛋白或其他材料的异质群体的部分时，或当表达带标签的肽或蛋白的细胞是细胞的异质群体（例如，生物样品）的部分时。

[0123] 在某些实施方案中，标记包括荧光标记，如青色染料，香豆素，罗丹明，夹氧杂蒽（xanthene），荧光素或其磺化衍生物，或荧光蛋白。备选地，结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白可以包含生色报告酶，如辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶（AP）。在其他实施方案中，标记可以是标签分子。在一些实施方案中，标记可以是用于体外成像的标签。在另外的实施方案中，标记可以是用于分离结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白的标签。在另外的实施方案中，标记是肽标签或蛋白标签，如，例如，Myc标签，His标签或Strep标签®。

[0124] 在任一前述实施方案中，结合蛋白（a）可以能够特异性结合内源存在于生物样品的细胞中的蛋白，ROR1和/或表位，所述样品任选地包含福尔马林固定的或冷冻的组织切片和/或经渗透化的细胞和/或任选地来源于受试者的肿瘤。在一些实施方案中，样品来源于肿瘤组织，所述肿瘤组织选自由以下各项组成的组：血液恶性肿瘤和实体瘤。在特别的实施方案中，样品（a）来源于CLL或MCL或（b）来源于卵巢癌，肺癌，所述肺癌任选地选自肺腺癌，腺癌，鳞状细胞癌，小细胞癌，和非典型类癌，或乳腺癌，所述乳腺癌任选地是三阴性乳腺癌。在其他实施方案中，样品来源于正常组织，所述正常组织选自由以下各项组成的组：骨髓，脂肪组织，副甲状腺，食管，和胰腺。

[0125] 在任一前述实施方案中，所述结合蛋白任选地特异性结合全长ROR1。

[0126] 在任一前述实施方案中，所述结合蛋白可以能够在参比抗体无法检测 ROR1的内源表达的条件下检测所述内源表达，所述参比抗体任选地选自由以下各项组成的组：多克隆ROR1抗体，识别ROR1的N端部分的ROR1抗体，ab135669，抗-人ROR1山羊多克隆抗体，抗-人ROR1兔多克隆抗体，抗-ROR1 4A5，和抗-人ROR1 2A2。

[0127] 在另一方面，本公开提供组合物，所述组合物包含如本文中所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白或抗体或其结合片段以及药用载体，稀释剂或赋形剂。用于诊断和治疗用途的药用载体是制药领域中已知的，并被描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro (Ed.)), 18th Edition, 1990) 和CRC

Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients, CRC Press LLC (S.C. Smolinski, ed., 1992)。示例药用载体包括任意佐剂, 载体, 赋形剂, 助流剂, 稀释剂, 防腐剂, 染料/着色剂, 表面活性剂, 湿润剂, 分散剂, 助悬剂, 稳定剂, 等张剂, 溶剂, 乳化剂, 或其任意组合。例如, 处于生理pH的无菌盐水和磷酸盐缓冲盐水可以是合适的药用载体。防腐剂, 稳定剂, 染料等也可以被提供在药物组合物中。此外, 也可以使用抗氧化剂和助悬剂。药物组合物也可以含有稀释剂如水, 缓冲剂, 抗氧化剂如抗坏血酸, 低分子量多肽(小于约10个残基), 蛋白, 氨基酸, 碳水化合物(例如, 葡萄糖, 蔗糖, 糊精), 螯合剂(例如, EDTA), 谷胱甘肽和其他稳定剂和赋形剂。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是示例的稀释剂。

[0128] 抗-ROR1结合蛋白的用途

[0129] 在另一方面, 本公开提供用于鉴定表达全长ROR1的细胞的方法。在一些实施方案中, 用于鉴定在其细胞表面上表达ROR1和/或表达ROR1的细胞的方法, 包括将细胞与如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白接触, 并检测结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白与所述细胞的特异结合, 由此鉴定表达全长ROR1的细胞。在某些实施方案中, 检测的全长ROR1是由细胞正常或内源表达的ROR1。在另外的实施方案中, 被接触的细胞已在遗传上被改造从而过表达内源或异源ROR1。在某些实施方案中, 细胞被福尔马林固定并被包埋在石蜡中。在其他实施方案中, 细胞被冷冻并被包埋在最适切割温度化合物(OCT)中。例如, 通过免疫组化探测全长ROR1在制备的所述细胞或组织中的存在。在其他实施方案中, 全长ROR1在细胞中的存在通过免疫印迹检测, 所述免疫印迹通过探测获自所述细胞的溶胞产物来进行。

[0130] 在另一方面, 提供检测方法, 所述检测方法包括(a)将生物样品与如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白接触; 并(b)检测所述结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白与样品中的肽或表位的特异结合, 或其缺乏, 其中所述方法由此检测样品中是否存在ROR1或ROR1表位。在一些实施方案中, 检测方法还包括将(b)中检测的特异结合水平与参比水平相比, 其中与参比水平相比增加的结合水平指示样品中存在ROR1或ROR1表位。在特别的实施方案中, 样品获得自受试者。在另外的实施方案中, 样品包含组织切片和/或细胞。在某些实施方案中, 样品包含福尔马林固定的或冷冻的组织切片和/或经渗透化的细胞和/或所述样品来源于肿瘤, 所述肿瘤选自由以下各项组成的组: 血液恶性肿瘤和实体瘤; 和/或来源于正常组织。例如, 在特别的实施方案中, 样品(a)来源于CLL或MCL或(b)来源于卵巢癌, 肺癌, 所述肺癌任选地选自肺腺癌, 腺癌, 鳞状细胞癌, 小细胞癌, 和非典型类癌, 或乳腺癌, 所述乳腺癌任选地是三阴性乳腺癌; 或(c)来源于选自由以下各项组成的组的正常组织: 骨髓, 脂肪组织, 副甲状腺, 食管, 和胰腺。在一些实施方案中, 样品包含被福尔马林固定并被包埋在石蜡中的细胞, 或被冷冻并被包埋在最适切割温度化合物(OCT)中的细胞。在一些实施方案中, 全长ROR1在细胞中的存在通过免疫组化或免疫印迹检测。

[0131] 在另一方面, 本公开提供用于鉴定ROR1在组织样品中的存在的方法。在一些实施方案中, 所述方法包括将组织样品与如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白接触, 并检测与组织的特异结合, 由此鉴定表达ROR1的组织, 所述ROR1任选地是全长和/或细胞表面ROR1。在某些实施方案中, 组织样品被福尔马林固定并被包埋在石蜡中。在其他实施方案中, 组织样品被冷冻并被包埋在最适切割温度化合物(OCT)中。在另外的实施方案中, 全长ROR1在组织样品中的存在通过免疫组化检测。在另外的实施方案中, 全长ROR1在组织

样品中的存在通过免疫印迹检测,所述免疫印迹通过探测细胞溶胞产物进行。

[0132] 在一些实施方案中,提供用于量化全长ROR1在细胞或组织样品中的量的方法。在某些实施方案中,所述方法包括将细胞或组织与如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白接触,并量化所述结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白与所述细胞的特异结合,由此量化细胞或组织的全长 ROR1的量。在一些实施方案中,细胞表达的全长ROR1是正常内源表达的ROR1。在其他实施方案中,细胞已被遗传改造成过表达ROR1。在另外的实施方案中,细胞或组织样品被福尔马林固定并被包埋在石蜡中。在其他实施方案中,细胞或组织样品被冷冻并被包埋在最适切割温度化合物 (OCT) 中。在另外的实施方案中,全长ROR1在细胞或组织样品中的量通过免疫组化检测。在其他实施方案中,全长ROR1在细胞中的量通过免疫印迹检测,所述免疫印迹通过探测细胞溶胞产物进行。

[0133] 在本公开另一方面中的是用于鉴定患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病或处于患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病的风险的受试者的方法。在本公开的某些实施方案中,受试者或生物来源可能被怀疑患有包括恶性疾病,病症或病况在内的疾病,病症或病况或处于患有其的风险中。当在本文中使用时,“风险”是受试者发展出特定疾病或病症的可能性(概率)。风险代表在一段时间(如1,2,3,4,或5年)内受试者发展出疾病的可能性。“高风险”指示受试者发展出特定疾病或病症的可能性大于50%。相反,“低风险”指示受试者发展出特定疾病或病症的可能性小于50%。在一些实施方案中,用于鉴定患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病或处于患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病的风险中的受试者的方法包括将来自受试者的组织样品与如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白接触并检测结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白与组织的特异结合,并且由此鉴定患有与表达ROR1或全长ROR1的细胞相关的疾病或处于患有与表达ROR1或全长ROR1的细胞相关的疾病的风险的受试者。

[0134] 例如,如果与对照样品相比,取自受试者的细胞或组织的测试样品具有可检测的或增加的全长ROR1水平,则可以将受试者鉴定为患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病或处于其风险中。在某些情况中,当全长 ROR1存在于测试样品中但不存在于对照中或在对照中不可检测时,可以将受试者鉴定为患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病或处于其风险中。在另外的实例中,测试和对照水平之间的差异可以为约2倍,约2.5 倍,约3倍,约3.5倍,约4倍,约4.5倍,约5倍,约5.5倍,约6倍,约6.5倍,约7倍,约7.5倍,约8倍,约8.5倍,约9倍,约9.5倍,约 10倍,约15倍,约20倍,约30倍,或更大。当被测试或与“对照”相比时,将生物样品称为“测试样品”。当在本文中使用时,“对照”是指来自相同患者和相同组织的未患病样品,来自未患有或被怀疑患有目的疾病的受试者的样品,来自未患有或被怀疑患有目的疾病的不同受试者的样品池(例如,包括来自2至约100,000个受试者的样品),或来自未患有或被怀疑患有目的疾病的一个或多个受试者的数据(例如,包含来自1至约5,000 至约10,000至约100,000至约1,000,000或更多受试者的关于生物标记水平的信息的数据库)。在某些实施方案中,分析“测试样品”并将结果(即, ROR1的表达)与包含由具有来源于多个分析的未患病或正常样品的数据的数据库计算的平均或特别指定的基线水平的“对照”比较。

[0135] 在一些实施方案中,测定中可以任选地包括“参比”或“标准”,其提供靶分子的标准量度或已知的基线水平(例如,“正常”水平)。在某些实施方案中,参比样品是来自健康个体(即,未患有或被怀疑患有目的疾病)的样品池(例如,组合的2,3,4,5,6,7,8,9,10或更多

个样品)。在某些情况中,在测定中将参比样品与“测试样品”和“对照样品”一起检验。在这些情况中,“测试”和“对照”样品可以被统称为“靶样品”,因为其与参比样品相比。

[0136] 在某些实施方案中,受试者可以被怀疑患有与表达全长ROR1的细胞相关的疾病或处于其风险中,并且在本公开的某些其他实施方案中,可以已知受试者没有此种疾病的风险或不存在此种疾病。在一些实施方案中,受试者被怀疑患有或处于风险中,因为受试者属于由具体特征(如年龄,性别,饮食,种族,家族史,或其组合)鉴定的亚群。在一些实施方案中,如果受试者具有基因突变或遗传病,则所述受试者被怀疑处于风险中。在一些实施方案中,与表达全长ROR1的细胞相关的疾病是过度增殖疾病或病症。例如,在某些实施方案中,过度增殖疾病或病症是肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤可以是血液肿瘤,如CLL或MCL。在另外的实施方案中,肿瘤可以是实体瘤,如乳腺癌,肺癌,卵巢癌,或胰腺癌肿瘤。例如,在一些实施方案中,癌症是腺癌,鳞状细胞癌,小细胞癌,或非典型类癌。在某些实施方案中,肺癌是肺腺癌。在某些其他实施方案中,乳腺癌是三阴性乳腺癌。在一些实施方案中,肿瘤包含原发性肿瘤,转移肿瘤,或两者。

[0137] 在包括检测结合蛋白的特异结合的任一前述方法中,所述方法还包括:如果所述方法确定在组织或组织中的细胞的至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,或至少90%的表面区域中检测到特异结合(表达 ROR1或其表位),则将受试者或样品鉴定为是利用抗-ROR1疗法的治疗(例如,免疫疗法,如过继细胞疗法)的候选者。

[0138] 在包括检测结合蛋白的特异结合的前述方法中,所述方法还包括:如所述方法确定的,如果发现样品所来源于的组织均一地或均质地表达 ROR1或其表位,则将所述受试者或样品鉴定为是利用抗-ROR1疗法的治疗(例如,免疫疗法,如过继细胞疗法)的候选者。

[0139] 在本公开的其他方面,提供用于鉴定患有过度增殖疾病或病症的受试者是否将受益于ROR1特异性治疗的方法,所述方法包括将来自受试者的组织样品与如本文所述的结合蛋白接触并检测结合蛋白与组织的特异结合,由此鉴定将受益于ROR1特异性治疗的受试者。在一些实施方案中, ROR1特异性治疗是免疫疗法,如包括施用表达ROR1 CAR,如Hudecek 等(Blood 116:4532-41,2010)所述的ROR1 CAR的T细胞的T细胞疗法。示例ROR1 CAR靶向ROR1的胞外部分,并因此靶向全长ROR1同种型而不靶向胞内同种型。因此,在一些实施方案中,提供用于鉴定将受益于 ROR1 CAR T细胞疗法的受试者的方法,其中如由结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白与组织的特异结合所指示的全长ROR1的表达,将受试者鉴定为能够受益于所述疗法。在某些实施方案中,治疗是免疫疗法,所述免疫疗法任选地是过继细胞疗法,所述过继细胞疗法任选地包含嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包含抗-ROR1抗体,所述抗-ROR1抗体任选地是命名为R12的抗体或与其竞争结合。抗体R12在Yang等(PLoS ONE 6:e21018, 2011)和Hudecek等(Clin.Cancer Res.19:3153,2013)中被公开,所述抗体及其抗原-结合片段通过引用结合于此。在一些实施方案中,如果所述方法确定在组织或组织中的细胞的至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,或至少95%或至少60%至至少85%或至少50%至至少90%的表面区域中检测到特异结合(表达 ROR1或其表位),则受试者被鉴定为将受益于ROR1特异性治疗的受试者。在一些实施方案中,如果所述方法确定样品所来源于的组织均一地或均质地表达ROR1或其表位,则受试者被鉴定为将受益于ROR1特异性治疗的受试者。在特别的实施方案中,ROR1特异性治疗是免疫疗法,如过继细胞疗法。在任一前述实施方案中,ROR1特异性治

疗包含嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包含抗-ROR1结合蛋白或抗体,如作为命名为R12的抗体或作为与R12抗体竞争结合的结合蛋白或抗体的抗体。

[0140] 在本发明更多的方面中,提供用于确定患有与表达全长ROR1的细胞相关的过度增殖疾病或病症的受试者的预后的方法,所述方法包括将来自受试者的组织样品与如本文所述的结合蛋白接触,并检测结合蛋白与组织的特异结合,其中在组织中检测到与全长ROR1的特异结合将受试者鉴定为在不存在ROR1特异性治疗的情况下具有不良预后。当在本文中使用时,“预后”是遭受特定疾病,病症或病况的受试者的临床结果的可能性。就癌症而言,预后表示受试者存活(如1,2,3,4,或5年)的可能性(概率)或肿瘤转移的可能性。“不良的预后”指示受试者不能存活至指定时间点(如1,2,3,4,或5年)的可能性大于50%,或肿瘤转移的可能性大于50%。相反,“良好预后”指示受试者存活至指定时间点(如1,2,3,4,或5年)的可能性大于50%,或肿瘤不转移的可能性大于50%。

[0141] 在一些实施方案中,由结合蛋白与组织的特异结合所指示的检测全长 ROR1,将受试者鉴定为患有肿瘤,肿瘤转移,或两者。在一些实施方案中,用于确定患有与表达全长ROR1的细胞相关的过度增殖疾病或病症的受试者的预后的方法包括将来自受试者的组织样品与如本文所述的结合蛋白接触,并检测结合蛋白与组织的特异结合,其中在组织中检测到全长 ROR1将受试者鉴定为在不存在ROR1特异性治疗的情况下具有不良预后。在任一所述实施方案中,组织样品被福尔马林固定并被包埋在石蜡中,或组织样品被冷冻并被包埋在OCT中。在某些实施方案中,全长ROR1 在组织样品中的存在通过免疫组化或免疫印迹检测。

[0142] 在包括检测结合蛋白的特异结合的任一前述实施方案中,所述方法还包括用抗-ROR1疗法,如免疫疗法治疗受试者。在某些实施方案中,免疫疗法包括过继细胞疗法。在任一所述实施方案中,抗-ROR1疗法包含对 ROR1特异的嵌合抗原受体,其中对ROR1特异的嵌合抗原受体包含抗 -ROR1抗体结合蛋白或结合结构域。在某些实施方案中,对ROR1特异的嵌合抗原受体包含来自命名为R12的抗体的结合结构域或包含与R12抗体竞争结合的结合结构域。

[0143] 在某些实施方案中,本文提供在人受试者中评估疗法的效力的方法,所述方法是通过施用疗法并确定疗法的效力。“效力”是疗法如果好地治疗疾病或减小疾病负担(如肿瘤尺寸或数目)的量度。可检测的ROR1的减少指示疾病负担的减小和良好的效力。可检测的ROR1水平无变化或可检测的ROR1水平的比率减小可以指示疗法是抑制肿瘤的(tumorstatic)。对统计学显著的可检测的ROR1水平的增加率没有影响指示不良效力,最小效力,或缺乏效力。在某些实施方案中,效力可以与存活时间相关。例如,与对照相比以统计学显著的方式增加患者存活时间的疗法与较高的效力相关。相反,与对照相比未以统计学显著的方式增加存活时间的疗法与不良,最小或无效力相关。

[0144] 在一些实施方案中,通过测量全长ROR1在细胞或组织样品中的表达(相比于对照或之前测量的水平)来评估治疗效力。在一些实施方案中,细胞或组织样品被福尔马林固定并被包埋在石蜡中,或细胞被冷冻并被包埋在最适切割温度化合物(OCT)中。全长ROR1在样品中的水平通过检测特异性结合全长ROR1的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白的量来测量。在一些实施方案中,结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白与细胞或组织的特异结合通过免疫组化或免疫印迹检测。在所述方法的一些方面,评估的疗法是手术,化疗,细胞毒性疗

法,免疫介导疗法,靶向疗法,放疗,或放化疗,或其任意组合。在一些实施方案中,所述疗法治疗过度增殖疾病或病症,如癌症。在一些实施方案中,所述疗法是免疫疗法,如T细胞疗法,所述T细胞疗法包括施用表达ROR1 CAR,如Hudecek等 (Blood 116: 4532-41, 2010) 中所述的ROR1 CAR的T细胞。

[0145] 在另外的方面,本公开提供治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者施用抗-ROR1疗法,其中所述受试者的疾病或病症的组织或样品已被鉴定为具有表面表达的ROR1的均一或均质的表达。在某些实施方案中,疾病或病症是肿瘤,如实体瘤或血液肿瘤(例如,所述肿瘤是CLL, MCL,乳腺癌,肺癌,卵巢癌,或胰腺癌肿瘤;或所述肿瘤是肺腺癌,腺癌,鳞状细胞癌,小细胞癌,非典型类癌,或三阴性乳腺癌)。在某些实施方案中,治疗方法包括向患有选自肺腺癌,腺癌,鳞状细胞癌,小细胞癌,非典型类癌,和三阴性乳腺癌的疾病或病症的受试者给药。在特别的实施方案中,抗-ROR1疗法包括免疫疗法,如过继细胞疗法或表达嵌合抗原受体的细胞,所述嵌合抗原受体包含抗-ROR1抗体片段,如命名为R12的抗体(参见Yang等,PLoSOne 6:e21018, 2011,和Hudecek等,Clin.Cancer Res.19:3153, 2013,所述抗体及其抗原-结合片段通过引用结合于此)。

[0146] 在一些实施方案中,提供治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者施用抗-ROR1疗法,其中受试者的疾病或病症的组织或样品已被鉴定为具有表面表达的ROR1的均一或均质的表达。在某些实施方案中,所述疾病或病症是肿瘤,所述肿瘤任选地是实体瘤或血液肿瘤。在一些另外的实施方案中,所述肿瘤选自由以下各项组成的组:CLL, MCL,乳腺癌,肺癌,卵巢癌,和胰腺癌。在特别的实施方案中,所述肿瘤是肺腺癌,腺癌,鳞状细胞癌,小细胞癌,非典型类癌,或三阴性乳腺癌。在一些实施方案中,抗-ROR1疗法包括免疫疗法,如过继细胞疗法。在一些实施方案中,免疫疗法包括表达嵌合抗原受体的细胞,所述嵌合抗原受体包含抗-ROR1抗体片段。在特别的实施方案中,嵌合抗原受体包含来源于命名为R12的抗体,含有其抗原-结合区的抗体,或与命名为R12的抗体竞争结合的抗体的抗-ROR1抗体片段。在另外的实施方案中,表达嵌合抗原受体的细胞包括T细胞或NK细胞。在前述实施方案中,表面表达的ROR1的表达使用本文公开的方法确定。

[0147] 在另一方面,本公开提供试剂盒,所述试剂盒包含可用于进行根据本发明的诊断方法的材料。在某些方面,提供包含如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒用于检测全长ROR1在细胞或组织样品中的存在。在一些这样的实施方案中,所述试剂盒被用于检测全长ROR1在组织样品中的存在,并且所述组织样品被福尔马林固定并被包埋在石蜡中。在其他实施方案中,组织样品被冷冻并被包埋在OCT中。在一些实施方案中,全长ROR1在组织样品中的存在通过免疫组化或免疫印迹检测。在一些实施方案中,所述试剂盒包括包含HRP的二抗。

[0148] 在另外的其他方面,提供包含组合物的试剂盒,其中所述组合物包含如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白以及载体或赋形剂。在一些实施方案中,所述试剂盒被用于检测全长ROR1在细胞或组织样品中的存在。在一些实施方案中,所述样品是被福尔马林固定并被包埋在石蜡中的组织样品。在其他此种实施方案中,组织样品被冷冻并被包埋在OCT中。在一些实施方案中,全长ROR1在组织样品中的存在通过免疫组化或免疫印迹检测。在一些实施方案中,所述试剂盒包括包含HRP的二抗。

[0149] 本文所述的用于鉴定全长ROR1的存在的方法可以由诊断实验室,实验性实验室或

执业医师进行。本发明提供试剂盒,所述试剂盒可用于这些不同的设定。根据本文中的方法的用于表征生物样品和诊断受试者中的过度增殖疾病或病症的材料和试剂可以被一起装配在试剂盒中。在某些方面,所述试剂盒包含如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白,以及根据本公开的方法使用试剂盒的使用说明。

[0150] 包含如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白的试剂盒可以进一步包含用于固定抗原结合分子的一个或多个基底,包括微阵列载玻片,小珠,塑料管或其他表面,二抗,标记缓冲液或试剂,洗涤缓冲液或试剂,免疫检测缓冲液或试剂,和检测工具。用于使用这些缓冲液和试剂来进行方法的不同步骤的方案可以被包含在试剂盒中。试剂可以固体(例如,冻干的)或液体形式提供。本公开的试剂盒可以任选地包含不同的容器(例如,载玻片,小瓶,安瓿,试管,烧瓶或瓶子)以用于每种单独的缓冲液或试剂。各组分通常将适合等分在其各自容器中或以浓缩形式提供。也可以提供适用于进行公开的方法的特定步骤的其他容器。试剂盒的各容器优选保持紧密密封以用于商业销售。

[0151] 在某些实施方案中,本公开的试剂盒还包括对照样品,对照载玻片,参比样品,参比载玻片,或其任意组合。根据本公开的一个或多个方法使用试剂盒的使用说明可以包括用于处理获得自受试者的生物样品,进行测试的使用说明,或用于解释结果的使用说明,或其任意组合。本公开的试剂盒还可以包括管理药物或生物制品的制备,使用或销售的政府机构(例如,FDA)所规定形式的注意事项。

[0152] 用于制备抗-ROR1结合蛋白的核酸和宿主细胞

[0153] 在另一方面,本公开提供编码如本文所述的免疫球蛋白结合结构域或免疫球蛋白样结合蛋白的分离的多核苷酸。在某些实施方案中,编码免疫球蛋白结合结构域或蛋白的多核苷酸可以进行密码子优化以增强或最大化在特定类型细胞中的表达(例如,Scholtens等,Clin.Immunol.119: 135-145,2006)。当在本文中使用时,"密码子优化的"多核苷酸是具有对应于足量的宿主细胞tRNA水平的沉默突变修饰的密码子的异源多肽。

[0154] 在一些实施方案中,核酸分子编码结合蛋白(例如,抗体重链和轻链,或包含 V_H 和 V_L 结合区的抗体结合结构域),其中两个以上结构域间隔以切割位点。在某些实施方案中,切割位点包含约在 V_H 或 V_L 氨基端的2至约20个氨基酸,在 V_H 或 V_L 羧基端的约2至约20个氨基酸,自切割氨基酸序列,或其组合。在某些实施方案中,切割位点包含在结合蛋白结构域的氨基末端或羧基末端的约2至约15,约2至约10,或约2至约5个氨基酸。在一些实施方案中,切割位点是自切割氨基酸序列,其包含来自猪捷申病毒(teschovirus)-1(P2A)(如SEQ ID NO.:17所示的氨基酸序列),马鼻A病毒(E2A)(如SEQ ID NO.:19所示的氨基酸序列),Thosesigna病毒(T2A)(如SEQ ID NO.:18所示的氨基酸序列),口蹄疫病毒(F2A)(如SEQ ID NO.:20所示的氨基酸序列)的2A肽,或其任意组合(参见,例如,Kim等,PLOS One 6:e18556,2011,所述2A核酸和氨基酸序列通过引用完整地结合于此)。

[0155] 在另一方面,提供包含编码如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白的多核苷酸的表达构建体。本公开还提供表达构建体,其包含编码结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白以及和肽标签或蛋白标签的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸可以与表达控制序列可操作相连。当在本文中使用时,"表达构建体"是指含有核酸分子的DNA构建体,所述核酸分子与能够在合适的宿主中影响所述核酸分子的表达的合适的控制序列可操作相连。表达构建体可以存在于载体(例如,细菌载体,病毒载体)中或可以整合到基因组中。术

语“可操作相连”是指两个或更多个多核苷酸在单个多核苷酸片段上缔合以致其功能彼此影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达时,所述启动子与所述编码序列可操作相连(即,编码序列在启动子的转录控制下)。术语“表达控制序列”(也称为调节序列)是指这样的多核苷酸序列,其影响与其可操作相连的编码序列的表达和加工。例如,表达控制序列可以包括转录起始,终止,启动子和增强子序列;有效的 RNA加工信号如剪接和多聚腺苷酸化信号;稳定胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;以及可能地增强蛋白分泌的序列。

[0156] 在一些实施方案中,表达构建体存在于载体中。“载体”是这样的核酸分子,其能够转运另一种核酸。载体可以是,例如,质粒,粘粒,病毒, RNA载体或直链或环状DNA或RNA分子,其可以包括染色体,非染色体,半合成或合成的核酸。示例载体是能够自复制(游离载体)或表达(表达载体)与其连接的核酸的载体。示例病毒载体包括反转录病毒,腺病毒,细小病毒(例如,腺病毒伴随病毒),冠状病毒,负链RNA病毒如正粘病毒(例如,流感病毒),棒状病毒(例如,狂犬病毒和水疱性口炎病毒),副粘病毒(例如,麻疹病毒和仙台病毒),正链RNA病毒如微小核糖核酸病毒和甲病毒,和双链DNA病毒,包括腺病毒,疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒1型和2型,Epstein-Barr病毒,巨细胞病毒),和痘病毒(例如,牛痘,鸡痘和金丝雀痘)。其他病毒包括例如诺沃克病毒(Norwalk virus),囊膜病毒,黄病毒,呼肠病毒,乳多泡病毒,嗜肝性DNA病毒,和肝炎病毒。反转录病毒的实例包括禽白血病性增生-肉瘤,哺乳动物C型,B型病毒,D型病毒,HTLV-BLV组,慢病毒,泡沫病毒(Coffin,J.M.,Retroviridae:The viruses and their replication,In Fundamental Virology,Third Edition,B.N.Fields等编辑,Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia,1996)。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些其他实施方案中,载体是病毒载体。在一些此种实施方案中,病毒载体是慢病毒载体或 γ -反转录病毒载体。

[0157] 在某些其他方面,本公开提供宿主细胞,所述宿主细胞包含如本文中所述的表达构建体或载体,或由如本文中所述的表达构建体提供的多核苷酸。当在本文中使用时,术语“宿主”是指细胞或微生物,其被靶向以用于进行利用异源或外源核酸分子的遗传修饰以制备目的多肽(例如,抗-ROR1 抗体或其抗原-结合片段)。在某些实施方案中,宿主细胞可以任选地已经具有或被修饰成包括给予与异源或外源蛋白的生物合成相关或无关的所需性质的其他遗传修饰(例如,包括可检测标记)。可以将超过一个异源或外源核酸分子引入到宿主细胞中作为单独的核酸分子,作为多个独立控制的基因,作为多顺反子核酸分子,作为编码融合蛋白的单个核酸分子,或其任意组合。当将两个以上外源核酸分子引入到宿主细胞中时,要理解的是两个以上的外源核酸分子可以这样引入:作为单个核酸分子(例如,在单个载体上),在单独的载体上,在单个位点或多个位点处整合到宿主染色体中。提及的异源核酸分子或蛋白活性的数目是指编码核酸分子的数目或蛋白活性的数目,而不是指引入到宿主细胞中的单独的核酸分子的数目。

[0158] 在另外的方面,本公开提供用于制备如本文所述的结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白的方法,所述方法包括在适于表达所述结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白的条件下培养包含如本文中所述的表达构建体或载体,或由如本文中所述的表达构建体提供的多核苷酸的宿主细胞,并且任选地从培养物中分离所述结合蛋白或免疫球蛋白样结合蛋白。

实施例

[0159] 实施例1

[0160] RoR1转录本表达的组织分布

[0161] 通过定量实时PCR在一组各种不同的人 and 恒河猴组织中表征Ror1转录本的表达。将RT-qPCR测定用于确定人和恒河猴组织中的ROR1表达。来自大部分组织的cDNA获得自BioChain®, 另外的cDNA样品使用 SuperScript-III First-Strand-合成试剂盒制备, 由来自人胰腺和结肠 (Clontech) 以及来自原代B-CLL细胞的RNA (1μg) 开始。将cDNA (2μL) 用于在7900HT快速实时PCR系统 (Life Technologies) 上使用 Power-SYBR-Green-PCR混合物的10-μL反应。针对持家基因GAPDH和 TATA-结合蛋白 (TBP) 的几何平均将ROR1表达归一化, 使用包括以下的基因特异性正向 (F) 和反向 (R) 引物:

[0162] 人ROR1-F: 5'-AGCGTGCGATTCAAAGGATT-3' [SEQ ID NO.: 39],

[0163] 人ROR1-R: 5'-GACTGGTGCCGACGATGACT-3' [SEQ ID NO.: 40],

[0164] 人GAPDH-F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' [SEQ ID NO.: 41],

[0165] 人GAPDH-R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' [SEQ ID NO.: 42],

[0166] 人TBP-F: 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3' [SEQ ID NO.: 43],

[0167] 人TBP-R: 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3' [SEQ ID NO.: 44],

[0168] 恒河猴ROR1-F: 5'-AGCTTGCGATTCAAAGGATT-3' [SEQ ID NO.: 45],

[0169] 恒河猴ROR1-R: 5'-GACTGGTGATGATGACT-3' [SEQ ID NO.: 46],

[0170] 恒河猴GAPDH-F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' [SEQ ID NO.: 47],

[0171] 恒河猴GAPDH-R: 5'-GAAGATGGTGATGGGGCTTC-3' [SEQ ID NO.: 48],

[0172] 恒河猴TBP-F: 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3' [SEQ ID NO.: 49], 以及

[0173] 恒河猴TBP-R: 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3' [SEQ ID NO.: 50]。

[0174] 引物效率和倍数变化使用Pfaffl方法 (Nucleic Acids Res. 29:e45, 2001) 确定, 并且确定相对于原代B-CLL细胞的表达。

[0175] 如图2所示, 在大多数正常组织中基本上检测不到Ror1转录本表达水平。但是, 与已知表达高水平的ROR1的CLL细胞相比, 在脂肪和胰腺中可检测到低水平的Ror1转录本。因此, 鉴于肿瘤中的高ROR1表达, 而正常组织显示最小至不可检测的ROR1表达, ROR1将成为一个好的治疗靶标, 因为其基本上是肿瘤相关抗原并且此种治疗将可能具有最小至不可检测的毒性。

[0176] 实施例2

[0177] 其他抗-ROR1抗体不能以免疫组织学方式检测ROR1

[0178] 将若干公布的或可商购的抗-ROR1抗体作为免疫组化 (IHC) 试剂在多种细胞系和组织上进行测试以检验其特异性检测ROR1表达的能力。使用针对各抗体公布的专门方案在福尔马林固定的-石蜡包埋的 (FFPE) 细胞和组织上进行IHC测定。测试的抗-人ROR1抗体是抗-人ROR1 ab135669 (兔多克隆抗体, 来自 **abcam®**, Cambridge, MA) (Zhang等, Sci. Rep. 24:5811, 2014), 抗-人ROR1 (山羊多克隆抗体AF2000, 来自R&D Systems, Minneapolis, MN) (Dave等, PLoS One 7:e52655, 2012), 抗-人ROR1 #4102 (兔多克隆抗体, 来自Cell Signaling Technologies, Danvers, MA) (Yamaguchi等, Cancer Cell 21:348, 2012), 抗-人ROR1 4A5 (小鼠单克隆抗体) (Zhang等, Am. J. Pathol. 181:1903, 2012), 和抗-

人ROR1 2A2(小鼠单克隆抗体,来自BioLegend, San Diego, CA)。

[0179] 利用可商购的ROR1特异性抗体的IHC染色使用公布的方案(参见 Zhang等,2014; Dave等,2012; Yamaguchi等,2012; Zhang等, 2012)。对于4A5单克隆抗体,抗原提取(Trilogy-30分钟,高盐缓冲液-30 分钟)之后是一抗(8 μ g/mL)过夜和CSA扩增(研究者方案)或抗-小鼠聚合物。所有抗体的染色利用DAB可视化。

[0180] 在第一实验中,在以下细胞中确定ROR1表达:(1) K562 (ROR1⁻) 细胞(阴性对照); (2) 扁桃体组织 (ROR1⁻) (阴性对照); (3) 转染有Ror1的 K562细胞,其过表达全长ROR1 (ROR1⁺) (阳性对照); (4) CLL淋巴结 (ROR1⁺, 全长); 和MCL淋巴结 (ROR1⁺, 全长)。若干公布的抗体能够检测K562细胞中全长ROR1的过表达(褐色染色所示),但是没有一种测试的已知抗体能够检测在CLL和MCL淋巴结中内源表达的全长ROR1(图 3A)。

[0181] 在第二实验中,确定以下中的ROR1表达:(1) 转染有Ror1的K562 细胞 (ROR1⁺); (2) K562 (ROR1⁻) 细胞; (3) CLL淋巴结组织 (ROR1⁺, 全长); 和 (4) 扁桃体组织 (ROR1⁻)。类似于第一实验,大部分测试的抗-ROR1抗体使过表达ROR1的转导的细胞染色但是不染色FFPE CLL淋巴结样品(图 3B)。尽管尝试使用多种抗原提取和染色条件,没有鉴定对于在正常扁桃体上具有最小背景的CLL淋巴结中ROR1的可重复的检测(数据未示)。

[0182] 可获得的试剂无法染色ROR1可能是由于若干原因。抗体在全长 ROR1的N端区域中识别的表位可以被福尔马林固定所破坏,并且IHC步骤中的抗原提取过程可能不能够恢复足够的用于抗体识别的表位。与此可能性一致的是,被转染以过表达全长ROR1的CLL细胞或K562细胞的福尔马林固定减少通过流式细胞术分析的ROR1检测(图4)。此外,通过免疫印迹检测到,与CLL细胞相比,被转染以过表达ROR1的K562 细胞的ROR1水平高得多(图4)。因此,目前可获得的抗-ROR1试剂的灵敏度不足以检测癌组织中表达的内源ROR1水平。

[0183] 因此,某些可获得的抗-ROR1抗体不是完全令人满意的,例如,在以最佳灵敏的和特异性的方式检测肿瘤和/或其他组织上,例如,在福尔马林固定的或以其他方式制备的组织中的内源ROR1表达的能力方面。

[0184] 实施例3

[0185] 对全长ROR1具有特异性的抗体

[0186] 产生抗体,其在一些方面可用作能够检测内源全长ROR1 (ROR1_v1) 而不与短的胞内ROR1同种型 (ROR1_v2) 交叉反应的诊断,检测和/或预后试剂。特别地,仅存在于全长ROR1中(并且通常是唯一定位于例如癌症细胞的细胞表面的同种型)的ROR1的C端部分被用于产生一组抗体。简言之,将雌性BALB/c和CD1小鼠用一组对应于位于人ROR1的C端区域中的氨基酸的四肽免疫(图5)。因为ROR1在小鼠和人之间高度保守(97%氨基酸同源性),选择来自人和小鼠ROR1之间具有最大氨基酸差异(但是与人蛋白质组中的其他序列具有最小同源性)的ROR1_v1的胞内区域的肽来促进引起小鼠中的免疫应答。将四个合成的肽与KLH偶联。测试来自免疫的小鼠的多克隆血清以鉴定具有高效价抗-ROR1抗体的小鼠。通过免疫印迹针对ROR1⁺CLL和K562ROR1⁻细胞溶胞产物使用WES免疫印迹设备(ProteinSimple, Bio-Techne)筛选多克隆血清。然后,使用常规方法,由具有高抗-ROR1效价的小鼠的脾细胞制备杂交瘤以产生单克隆抗体,并且基于与荧光标记的靶抗原的结合选择1222个克隆。挑取杂交瘤并使用载有ROR1肽混合物的细胞计数小珠阵列针对肽结合进行排序。

[0187] 使用免疫印迹和免疫组化(IHC)分析筛选来自上部133个杂交瘤克隆的上清。将免

疫印迹分析用于针对对ROR1特异的抗体对上清进行初始筛选。使用裂解缓冲液[10mM Tris-HCl (pH 8.0), 130mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 5mM EDTA, 和蛋白酶抑制剂混合物 (Roche)] 制备全细胞溶胞产物。将细胞沉淀以 1×10^7 个细胞/ml 重悬在裂解缓冲液中并且在冰上孵育10分钟, 之后在4℃以13,000rpm离心15分钟。使用BCA蛋白测定试剂盒 (Thermo Scientific Pierce) 确定上清中的蛋白浓度。在WES免疫印迹系统 (Altogen Labs, Austin, TX) 上使用标准方案运行来自CLL细胞的细胞溶胞产物, 并利用抗-小鼠HRP可视化。通过免疫印迹针对来自原代 CLL细胞 (ROR1⁺) 和ROR1⁻K562细胞的溶胞产物筛选来自免疫的小鼠的多克隆血清, 以鉴定检测到对应于全长ROR1的130kDa条带的血清 (图 6A)。鉴定了识别CLL细胞的溶胞产物中的130kDa ROR1条带 (ROR1_v1) 的若干克隆 (图6B)。通过免疫印迹, 克隆6D4特异性检测到清晰的130kDa ROR1条带 (图6B)。杂交瘤6D4进行随后的两轮亚克隆, 重复验证肽结合。

[0188] 然后通过IHC分析将检测到ROR1_v1的克隆针对一组不同的FFPE 组织 (K562/ROR1⁺细胞系, K562细胞, CLL淋巴结, 和多个正常扁桃体组织) 进行测试。切割四微米组织切片并用Leica Bond Rx (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) 染色。将切片用H2缓冲液预处理20分钟。利用3%过氧化氢将内源过氧化酶封闭5分钟。施用蛋白封闭液达10分钟 (15%山羊血清, 5%人血清, 在抗体稀释液中)。对于小鼠抗-ROR1 6D4单克隆抗体, 以1:50稀释使用抗体并将其施用至组织达30分钟, 然后使用 Leica PowerVision HRP小鼠特异性聚合物 (PV6110) 检测任何结合的6D4 抗体达12分钟并利用Refine DAB (Leica Biosystems) 和苏木素复染剂将染色可视化。每次运行都包括同种型对照 (IgG) 切片 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)。DAB底物的褐色指示特异结合。

[0189] 针对以下细胞类型的FFPE样品测试纯化的来自克隆6D4的单克隆抗体: (1) K562细胞 (ROR1⁻); 和 (2) 被转染以过表达全长ROR1的K562细胞 (K562/ROR1⁺)。抗-ROR1单克隆抗体6D4针对K562/ROR1⁺以高水平显示清楚的膜染色并且在ROR1⁻K562细胞中没有背景染色 (图7)。还针对一组原代人CLL和MCL肿瘤淋巴结测试了抗-人ROR1 6D4抗体以确定其是否能够检测内源全长ROR1表达, 正常人扁桃体组织 (ROR1⁻) 作为阴性对照。抗-ROR1单克隆6D4在CLL和MCL肿瘤细胞中显示清楚的特异性膜染色, 而在正常扁桃体组织上无背景染色 (图8)。这些结果证明除了检测转染的细胞中的ROR1过表达以外, 纯化的单克隆抗-ROR1 6D4抗体还能够灵敏地检测至少两种不同肿瘤类型中内源表达的ROR1。

[0190] 相反, 来自许多其他克隆的上清将过表达ROR1的K562细胞染色但是无法检测FFPE CLL淋巴结中的内源ROR1 (图9A和9B)。

[0191] 抗-ROR1单克隆抗体克隆6D4特异性结合用于免疫小鼠的四种不同 ROR1肽的混合物中的一种ROR1肽片段。发现抗-ROR1单克隆抗体6D4 结合位于全长ROR1 (ROR1_v1) 的C端区域中的人ROR1肽 786-NPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIP-814 (SEQ ID NO.: 3) 内的表位 (参见图5)。使用用于第二靶点去卷积 (secondary target deconvolution) 的细胞计数小珠阵列 (CBA) (BDTM Elispot, San Jose, CA) 来定位所述表位。

[0192] 综上, 这些研究证明抗-ROR1单克隆抗体6D4能够特异且灵敏地检测人细胞和组织 (如癌组织) 中内源表达的全长ROR1。

[0193] 实施例4

[0194] 验证单克隆抗体6D4的特异性

[0195] 进一步评估纯化的6D4单克隆抗体与ROR1和ROR2的结合。简言之,将编码人ROR1_v1 (NP_005003.2) 和ROR2 (pDOMR223-ROR2-Addgene) 的核酸分子克隆到反转录病毒载体中,如Leisegang等所述(J.Mol.Med. 86:573,2008)。细胞系K562,JeKo-1,MDA-MB-231,NCI-H1975和293T 获得自ATCC。将K562细胞转导以表达人ROR1_v1,人ROR2 (SEQ ID NO.:56) 和恒河猴ROR1_v1 (SEQ ID NO.:58) 肽的反转录病毒载体。用抗-ROR1 (克隆2A2-Miltenyi) 和抗-ROR2 (R&D Biosystems-FAB20641G) 或同种型进行流动染色,如前所述(参见Berger等,Cancer Immunol.Res.3:206, 2015)。

[0196] 抗体6D4将K562/ROR1染色,针对K562细胞或表达人ROR2的K562 为最小背景,并将造血和上皮肿瘤细胞系(包括JeKo-1,MDA-MB-231,和NCI-H1975) 染色,其还通过使用被良好表征的克隆2A2的流式细胞术显示细胞表面ROR1染色(图10A)。在表达人ROR2的K562细胞中没有观察到染色(图10A,左下)。还在将CLL和MCL淋巴结和PBMC染色方面测试了纯化的6D4,并且观察到均匀膜染色以及在正常人扁桃体上的最小背景(图10B)。来自K562/ROR1,原代CLL和MCL细胞,以及具有6D4 的ROR1⁺肿瘤细胞系的溶胞产物的免疫印迹检测到与全长ROR1相符的 130kDa条带(图10C)。

[0197] 这些结果证明6D4单克隆抗体以比之前的试剂更高的灵敏度特异性检测原发性肿瘤上全长ROR1的内源细胞表面表达,并且不存在针对 ROR2的交叉反应性。

[0198] 实施例5

[0199] 使用抗-ROR1单克隆抗体6D4鉴定表达ROR1的实体瘤

[0200] 为了确定抗-ROR1单克隆抗体6D4是否能够检测组织如患病组织中的内源ROR1,如实体瘤中的ROR1细胞表面表达,将纯化的抗-ROR1单克隆抗体6D4用于在乳腺癌,肺癌,卵巢癌,和胰腺癌的福尔马林固定的-石蜡包埋的 (FFPE) 样品上的免疫组化 (IHC) 测定。

[0201] 如实施例3中所述制备IHC样品。由两个独立的委员会授予资格的病理学家针对细胞表面ROR1对肿瘤组织进行评分并且将得分平均。组织被评分为‘0-阴性’,‘1-使用抗体的低膜染色’,‘2或3-使用抗体的高膜染色’(图 11)。均匀和不均匀染色分别被定义为大于50%和小于30%的肿瘤细胞上的染色。

[0202] 6D4抗体对上皮癌肿瘤细胞的灵敏性和特异性

[0203] 在第一研究中,发现与同种型对照相比,抗-ROR1单克隆抗体6D4 能够灵敏且特异地结合表达全长ROR1的肿瘤细胞。特别地,发现ROR1 在具有三阴性乳腺癌,肺腺癌和卵巢癌组织的患者亚组中高度表达(图12)。在该研究中,分别观察到50%,75%和50%的卵巢癌,肺腺癌和三阴性乳腺癌具有均匀ROR1表达。如图13所示,在多种肺癌类型(包括腺癌,鳞状细胞癌,小细胞癌和非典型类癌)中也观察到染色。如图14和15所示,抗体仅在正常人组织(包括副甲状腺,胰岛和食管区域)的亚组中检测到低的ROR1水平。

[0204] 上皮癌中的ROR1表达

[0205] a. 卵巢癌

[0206] 在之前公布的研究中,发现约50%的卵巢癌表达Ror1转录本,并且带有具有高Ror1转录本水平的肿瘤的患者具有不良的无病和无转移存活 (Zhang等,Scientific Reports 4:5811,2014)。然而,在所述研究中,ROR1 的IHC分析将染色主要定位于肿瘤细胞胞质和细胞核,这不同于肿瘤细胞系上全长ROR1_v1的细胞表面表达。

[0207] 因此,在IHC中使用6D4单克隆抗体检验由多种组织学的159例卵巢癌组成的两个

组织微阵列。使用6D4,百分之五十(50%)的卵巢癌显示占优势的膜和胞质染色(图16A)。在92%的肿瘤中,ROR1被均匀表达,均匀表达被定义为大于50%的细胞的明确的膜染色,并且阳性肿瘤中的染色强度可以基于细胞表面染色的强度而被分类为高或低(图11)。当被分组到组织学亚型中时,约90%的子宫内膜样腺癌为ROR1⁺并且60%的阳性肿瘤为ROR1^高,74%的浆液性乳头状癌为ROR1⁺其中50%评级为ROR1^高,44%的粘蛋白腺癌为ROR1⁺(31%ROR1^高);并且37%的浆液性腺癌为ROR1⁺(50%ROR1^高) (图16B,16C)。在某些卵巢癌亚型如透明细胞癌和粘蛋白乳头状腺癌中细胞表面ROR1少或不存在。检验少量的转移样品(1 透明细胞,4浆液性乳头状癌,和7浆液性腺癌)并且75%的转移浆液性乳头状癌和40%的浆液性腺癌为ROR1⁺。这些结果证明6D4mAb检测大部分乳腺癌中的细胞表面、全长ROR1,并且可以用于确定ROR1表达的预后指示并鉴定适合于ROR1靶向疗法的患者。

[0208] b. 乳腺癌

[0209] 之前使用公众可获得的GEO数据组检验乳腺癌中的ROR1基因表达,并且高ROR1表达与上皮-间质转化(EMT)基因标记和较低的无转移存活相关(Zhang等,PloS One 7: e31127,2012;Cui等,Cancer Research 73:3649,2013)。这些报道之一通过IHC观察到在70%的原发癌症中的ROR1蛋白表达(75%的小叶乳腺和70%的导管乳腺为ROR1⁺),但是使用所述研究中所用的试剂的染色定位于细胞核和细胞质,表明检测到的蛋白不可能是ROR1的细胞表面、全长变体(Zhang等,2012)。一个独立组通过IHC检验了三阴性乳腺癌(TNBC)中的ROR1并且发现22%为ROR1⁺并且这些患者具有较短的无病存活(Chien等,Virchows Archiv 468:589,2016)

[0210] 在该研究中,针对ROR1使用6D4 mAb分析24ER/PR⁺,12Her2⁺和60TNBC样品(图17A-17C)。在低百分比的ER/PR⁺中观察到低ROR1染色(12%ROR1⁺)并且在HER2⁺肿瘤中没有观察到ROR1表达。然而,ROR1在TNBC中高度表达,其中57%的样品为ROR1⁺其中56%评级为ROR1^高并且74%显示均匀染色(图17B-17C)。

[0211] c. 肺癌

[0212] 在之前的研究中,通过微阵列和PCR在非小细胞肺癌中鉴定了Ror1 转录本(Yamaguchi等,Cancer Cell 21:348,2012;Karachaliou等,Translational Lung Cancer Research 3:122,2014)。利用不同的多克隆和单克隆抗体的IHC显示在24-90%的肺腺癌中的ROR1染色,肺腺癌构成所有肺癌的40%(Zhang等,The American Journal of Pathology 181:1903,2012; Yamaguchi等,Cancer Cell 21:348,2012;Liu et al.,PloS One 10: e0127092,2015)。其他肺癌亚型中的ROR1表达未被良好表征。

[0213] 使用6D4 mAb在不同组织学类型的137例原发性肺癌中检验到ROR1 表达。ROR1表达在肺腺癌频率最高(42%为ROR1⁺其中38%评级为ROR1^高)而鳞状细胞癌染色ROR1⁺最少(12%)(图18A-18C)。我们还观察到腺鳞状癌,大细胞癌,小细胞癌和非典型类癌肿瘤中的ROR1染色,但是检测的这些肿瘤过少以致无法精确评估阳性的频率(图18B-18C)。所有ROR1⁺肺肿瘤都显示均匀染色。

[0214] 因为已经报道了ROR1在EMT和肿瘤迁移中起作用,我们评估了相匹配的转移病变中的ROR1表达以确定原发性肿瘤中的ROR1表达是否被保持。在来自患有肺腺癌的患者30个原发性和相匹配的转移淋巴结中检验ROR1表达,50%的所述患者具有ROR1⁺肿瘤。在具有ROR1⁺原发性肿瘤的患者中,60%的相匹配的转移淋巴结保持ROR1⁺,并且40%为ROR1⁻(图

18D)。在两个患者中,原发性肿瘤为ROR1⁻而转移淋巴结为ROR1⁺。这些结果表明在增加的ROR1表达和肺腺癌中的转移潜能之间可能不存在直接相关,或远距离转移位点处的肿瘤生长可能不需要保持ROR1表达。

[0215] d胰腺癌

[0216] 之前的一项研究中已报道,胰腺癌频繁地(83%)表达ROR1(Zhang等, American Journal of Pathology 181:1903,2012)。

[0217] 使用6D4 mAb在38例胰腺癌中确定了细胞表面ROR1表达(图19A)。令人惊奇地,我们发现在小部分肿瘤中低水平(15%)表达的ROR1(图 19B)。

[0218] 概述

[0219] 总而言之,常见上皮癌症的当前分析显示高水平的细胞表面表达的全长ROR1存在于大部分的卵巢癌,TNBC和肺腺癌中。ROR1染色典型地是均质的,表明大部分此种肿瘤细胞可以易感于ROR1靶向疗法。

[0220] 这些结果支持将ROR1用作肿瘤相关抗原靶标,将其用ROR1特异性疗法(如免疫疗法)靶向,所述疗法包括在其细胞表面上表达抗-ROR1嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞,包括在其表面上表达ROR1的造血或实体瘤中。此外,抗-ROR1单克隆抗体6D4可用作灵敏且特异性的诊断试剂或作为用于ROR1特异性疗法的伴随诊断。

[0221] 实施例6

[0222] 正常恒河猴和人组织中的ROR1表达

[0223] 人

[0224] 对于靶向ROR1的抗体或过继T细胞疗法的一种担心在于由于ROR1 在正常组织上的表达所致的潜在的在靶(on-target)、脱肿瘤(off-tumor)毒性(Morgan等,Molecular Therapy 18:843,2010;Lamers等,Molecular Therapy 21:904,2013;Hassan等,Clinical Cancer Research 13:5144, 2007)。之前通过全组织溶胞产物的实时PCR或免疫印迹分析在正常组织中的ROR1表达的研究发现在正常组织中ROR1不存在或以低水平表达(Baskar等,Clinical Cancer Research 14:396,2008;Hudecek等,Blood 116:4532,2010;Dave等,PloS One 7:e52655,2012;Fukuda等,PNAS 105:3047,2008)。全组织cDNA池或溶胞产物是检测ROR1中重要的第一步,但是如果其定位于少部分细胞或组织区域则无法检测表达。流式细胞术已被用于显示细胞表面表达的全长ROR1存在于由脂肪细胞前体体外分化的脂肪细胞上,并且在骨髓中的正常B细胞分化的早期阶段(Hudecek 等,2010)。若干研究利用使用之前可获得的抗体试剂进行的IHC检测了正常组织中的ROR1表达,但是没有报道在正常组织中的细胞表面表达的 ROR1(脂肪细胞是例外)(Dave等,2012;Choi等,Clinical淋巴瘤,Myeloma & Leukemia 15 Suppl:S167,2015)。

[0225] 6D4 mAb对ROR1灵敏且特异并且可以检测在之前当使用其他抗体测试时被认为是ROR1阴性的正常组织上的ROR1。因此,通过IHC使用两个人多器官正常组织微阵列组评估了ROR1表达。ROR1不存在于脑,心,肺和肝中,但是在正常副甲状腺,胰岛细胞和胃肠道的多个区域中检测到明显的细胞表面染色(图20A-20C)。细胞表面ROR1表达于食管的基底上皮层,胃窦粘膜的表面和孔穴上皮细胞,以及十二指肠粘膜(吸收细胞,杯形细胞和隐窝上皮)中(图20B)。肠粘膜上的ROR1表达表现为在腔上皮上以及在细胞-细胞接合处之间更高(图20B)。细胞表面ROR1在空肠或回肠中没有观察到并且在升结肠和降结肠的表面和隐窝上皮

中观察到低水平(图20B)。

[0226] 鉴于之前的研究未通过IHC在正常组织中检测到ROR1的事实,进行免疫印迹分析以确认利用6D4观察到的细胞表面染色不反映与另一蛋白的交叉反应性。获得阳性组织的速冻样品并且制备细胞溶胞产物用于利用 6D4和之前公布的多克隆山羊抗-ROR1抗体的免疫印迹分析(Dave等,2012)。此外,通过利用对ROR1_v1特异的引物的实时PCR制备cDNA(Berger等,Cancer Immunology Research 3:206,2015)。在来自CLL细胞的溶胞产物中以及在来自副甲状腺,胰岛,胃窦和胃体,食管,十二指肠和结肠的溶胞产物中,使用6D4和多克隆山羊抗-ROR1抗体都检测到与 130kDa全长ROR1蛋白相符的条带(图20D和20E)。与CLL相比,在来自组织如副甲状腺的溶胞产物中,ROR1条带的分子量稍高,这可能是由于翻译后修饰如N连接的糖基化的不同所致(图20D)。在用去除N连接的糖基化的PNGaseF处理溶胞产物后,在阳性组织中检测到100kDa的去糖基化ROR1蛋白条带,如Kaucka等之前所报道的(Acta Physiologica 203:351,2011)(图20F)。通过实时PCR测量人肠组织中的Ror1_v1转录本揭示了在胃和脂肪细胞中明显的Ror1转录本,但是这些组织的转录本水平低于来自CLL患者的外周血中的转录本水平(图21)。

[0227] 这些研究显示抗体6D4的灵敏度足以检测在若干正常成人组织中的细胞表面表达的全长ROR1。除了脂肪细胞(参见美国专利号9,163,258)以外,之前的报道未在副甲状腺,胰岛和胃肠道的区域(包括食管,胃和十二指肠)中检测到ROR1。

[0228] 恒河猴

[0229] 尽管有以上在人组织中的惊人发现,之前已经证明了ROR1-CAR T 细胞在临床前恒河猴(Macacca mulatta)模型中的安全性,其被认为是合适的,因为ROR1 CAR识别的表位是保守的,并且正常恒河猴组织表达类似水平的Ror1转录本(Berger等,Cancer Immunology Research 3:206,2015)。即使是在灌输非常高剂量的功能性CAR-T细胞的情况下在恒河猴也没有观察到毒性(Berger等,2015)。

[0230] 为了进一步评估ROR1蛋白是否如在人中那样在恒河猴的相同的正常组织中表达,测试了6D4 mAb识别恒河猴ROR1(例如,SEQ ID NO.:58)的能力。对应于SEQ ID NO.:59的恒河猴ROR1表位与人ROR1的相应序列有1个氨基酸的差异(图23A)。首先,将K562和恒河猴T细胞转导以恒河猴ROR1(XP_014996735),如Berger等(2015)中所述,并用6D4 mAb 染色。被转导以表达恒河猴ROR1的细胞显示褐色染色,指示6D4抗体的结合(图23B)。此外,IHC在正常恒河猴组织组中进行并且显示如在人组织中观察到的在相同组织(包括副甲状腺,胰岛和包括基底食管上皮,胃窦粘膜的孔穴上皮细胞,以及十二指肠粘膜的肠腺在内的胃肠道)中的细胞表面ROR1(图23C和23D)。然而,与在人结肠中检测到的低水平不同,在恒河猴结肠中没有检测到ROR1。

[0231] 这些结果指示在恒河猴和人组织中ROR1的表达模式高度相似。Berger等(2015)观察到的在恒河猴中注入ROR1 CAR-T细胞后不存在毒性的临床,生物化学或组织学证据,指示运输至正常组织的ROR1-CAR T 细胞可能过低以致不能引起毒性,或这些组织中的抗原水平对于体内 CAR-T细胞识别来说可能是不足的。

[0232] 实施例7

[0233] 与ROR1表达成正比的ROR1特异性CAR靶向细胞

[0234] 为了确定通过6D4 mAb检测到的ROR1水平对于通过表达ROR1特异性CAR的T细胞的

识别是否足够,我们将原代人分化的脂肪细胞,胰岛细胞和腺泡细胞与ROR1-CAR T细胞共培养并且测量培养物上清中的细胞因子。原代脂肪细胞分化自人白色前脂肪细胞(Promo Cell)(Hudecek 等,Blood 116:4532,2010)。2000胰岛当量的原代人胰岛,腺泡细胞和用于胰岛培养的培养基由Prodo labs制备。人T细胞被用ROR1 CAR慢病毒转染以表达ROR1特异性R12scFv CAR,如Hudecek等(Clinical Cancer Research 19:3153,2013)中所述。以2:1的T细胞:靶标比率将原代脂肪细胞,胰岛和腺泡细胞与制备自两个独立供体的未转导的和ROR1-CAR T细胞共培养。在共培养24小时后收获上清并且通过多路免疫测定(Luminex)测定细胞因子制备。以5:1的T细胞:靶标比率进行靶标杀伤,使用羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)来标记靶细胞并且在孵育24小时后使用碘化丙啶(PI)来对死亡的靶细胞的百分比进行评分(参见Zaritskaya等,Expert Review of Vaccines 9:601,2010)。

[0235] 当与原代脂肪细胞和胰岛细胞孵育时,ROR1-CAR T细胞,而不是来自相同供体的模拟T细胞,分泌干扰素- γ ,GM-CSF和IL-2(图 22A-22C)。体外培养期间的细胞因子分泌水平正比于靶标上的ROR1表达。此外,ROR1-CAR T细胞裂解ROR1⁺K562/ROR1细胞和分化的脂肪细胞而不裂解K562细胞(图22D)。

[0236] 这些发现支持以下结论:ROR1-CAR T细胞靶向的细胞与由mAb 6D4 所指示的ROR1表达成比例。

[0237] 在本说明书中提及的和/或在申请数据单中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开,包括2016年2月2日提交的美国临时专利申请号62/290,337和2016年4月19日提交的美国临时专利申请62/324,876,通过引用完整地结合于此。上述多种实施方案可以组合以提供进一步的实施方案。如果需要采用不同专利,申请和公布的概念,实施方案的各方面可以被改进以提供进一步的实施方案。考虑到上面的详细描述,可以对实施方案进行这些及其他改变。

[0238] 一般而言,在下述权利要求中,使用的术语不应当解释成将权利要求限制为在说明书和权利要求书中公开的特定实施方案,而是应当解释为包括所有可能的实施方案以及这样的权利要求所具有的等同方案的整个范围。因此,本公开没有限制权利要求。

序列表

<110> 弗雷德哈钦森癌症研究中心
Balakrishnan, Ashwini
Hoffstrom, Benjamin G.
Randolph-Habecker, Julie
Riddell, Stanley R.

<120> 抗-ROR1抗体及其用途

<130> 360056.437W0

<140> PCT

<141> 2017-02-02

<150> US 62/290,337

<151> 2016-02-02

<150> US 62/324,876

<151> 2016-04-19

<160> 59

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 937

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

[0001]

```

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Leu Leu Ala Leu
 1          5          10          15
Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Glu Thr
 20          25          30
Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile
 35          40          45
Ser Ser Glu Leu Asn Lys Asp Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
 50          55          60
Asn Asn Ile Thr Thr Ser Leu Gly Gln Thr Ala Glu Leu His Cys Lys
 65          70          75
Val Ser Gly Asn Pro Pro Pro Thr Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
 85          90          95
Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Leu Ser Phe Arg Ser Thr Ile Tyr
100          105          110
Gly Ser Arg Leu Arg Ile Arg Asn Leu Asp Thr Thr Asp Thr Gly Tyr
115          120          125
Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly
130          135          140
Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Tyr
145          150          155
Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile
165          170          175
Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu
180          185          190
His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met
195          200          205
Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile
210          215          220
Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser
225          230          235
Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu
245          250          255
Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met
260          265          270
Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro
275          280          285
Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala
290          295          300
Asp Pro Ile Asn Lys Asn His Lys Cys Tyr Asn Ser Thr Gly Val Asp
305          310          315
Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Lys Ser Gly Arg Gln Cys Gln Pro
325          330          335
Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Thr His Thr Phe Thr Ala Leu Arg Phe
340          345          350

```

[0002]

```

Pro Glu Leu Asn Gly Gly His Ser Tyr Cys Arg Asn Pro Gly Asn Gln
355 360 365
Lys Glu Ala Pro Trp Cys Phe Thr Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ser Asp
370 375 380
Leu Cys Asp Ile Pro Ala Cys Asp Ser Lys Asp Ser Lys Glu Lys Asn
385 390 395 400
Lys Met Glu Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu
405 410 415
Ala Ile Ala Leu Leu Phe Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln
420 425 430
Lys Ser Ser Ser Ala Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys His Val Arg Gly
435 440 445
Gln Asn Val Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys
450 455 460
Ala Lys Glu Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
465 470 475 480
Glu Cys Ala Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly
485 490 495
Met Asp His Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn
500 505 510
Asn Pro Gln Gln Trp Thr Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala
515 520 525
Glu Leu His His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln
530 535 540
Glu Gln Pro Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Ile Asn Gln Gly Asp Leu
545 550 555 560
His Glu Phe Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser
565 570 575
Ser Asp Glu Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe
580 585 590
Leu His Ile Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
595 600 605
His Phe Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly
610 615 620
Glu Gln Leu His Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile
625 630 635 640
Tyr Ser Ala Asp Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Leu Leu Pro Ile
645 650 655
Arg Trp Met Pro Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ser Asp
660 665 670
Ser Asp Ile Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Phe
675 680 685
Gly Leu Gln Pro Tyr Tyr Gly Phe Ser Asn Gln Glu Val Ile Glu Met
690 695 700
Val Arg Lys Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg
705 710 715 720
Met Tyr Ser Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg
725 730 735
Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu
740 745 750
Ser Ser His Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr
755 760 765
Gln Thr Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro
770 775 780
Arg Tyr Pro Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly
785 790 795 800
Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe
805 810 815
Ile Pro Ile Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro
820 825 830
Ala Ala His Tyr Gln Pro Thr Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys
835 840 845
Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser
850 855 860
Thr Gly His Val Thr Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala
865 870 875 880
Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly
885 890 895
Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
900 905 910
Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His
915 920 925
Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Leu
930 935

```

<210> 2

<211> 19

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人ROR1的片段

<400> 2
Asn Gln Lys Ser Ser Ser Ala Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys His Val
1 5 10 15
Arg Gly Gln

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人ROR1的片段

<400> 3
Asn Pro Arg Tyr Pro Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro
20 25

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人ROR1的片段

<400> 4
Gln Glu Ala Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His
1 5 10 15
Pro Gly Gly

[0003]

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人ROR1的片段

<400> 5
Lys Ile Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His
1 5 10 15
Gly His

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人6D4抗体的片段

<400> 6
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人6D4抗体的片段

<400> 7
Val Asn Pro Ser Asn Gly Asn Thr
1 5

[0004]

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人6D4抗体的片段

 <400> 8
 Cys Gly Arg Leu Ala Tyr Trp
 1 5

 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人6D4抗体的片段

 <400> 9
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Glu Thr Tyr
 1 5 10

 <210> 10
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人6D4抗体的片段

 <400> 10
 Ala Ala Ser
 1

 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人6D4抗体的片段

 <400> 11
 Cys Leu Gln Thr Leu Lys Asn Pro Tyr Thr Phe
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗体的片段

 <400> 12
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Val Asn Pro Ser Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Leu 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
 Gly Arg Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ala
 100 105 110

 <210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 13
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Val Asn Pro Ser Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Leu 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
Gly Arg Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 14
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Val Asn Pro Ser Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Leu 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
Gly Arg Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

[0005]

<210> 15
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

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

<210> 16
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> P2A片段

<400> 17
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> T2A片段

[0006]

<400> 18
 Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> E2A片段

<400> 19
 Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 20
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> F2A片段

<400> 20
 Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20 25

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 抗体的片段

<400> 21
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 22
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 23
Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

[0007] <400> 24
Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 25
Asn Pro Ser Asn Gly Asn
1 5

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 26
Arg Val Asn Pro Ser Asn Gly Asn Thr Asp
1 5 10

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 27
Arg Val Asn Pro Ser Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

	Gly
	<210> 28
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 抗体的片段
	<400> 28
	Trp Ile Gly Arg Val Asn Pro Ser Asn Gly Asn Thr Asp
	1 5 10
	<210> 29
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 抗体的片段
	<400> 29
	Leu Ala Tyr
	1
	<210> 30
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 抗体的片段
	<400> 30
	Gly Arg Leu Ala
	1
[0008]	<210> 31
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 抗体的片段
	<400> 31
	Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Glu Thr Tyr Met Asn
	1 5 10 15
	<210> 32
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 抗体的片段
	<400> 32
	Asp Tyr Asp Gly Glu Thr Tyr Met Asn Trp Tyr
	1 5 10
	<210> 33
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 抗体的片段
	<400> 33
	Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
	1 5
	<210> 34
	<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 34
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu
1 5 10

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 35
Leu Gln Thr Leu Lys Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 36
Leu Gln Thr Leu Lys Asn Pro Tyr
1 5

<210> 37
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

[0009]

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 37
Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr Ser Val Lys Met Ser Cys
1 5 10 15
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Lys
20 25 30
Gln Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Asn Pro Ser
35 40 45
Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
50 55 60
Thr Val Asp Lys Ser Leu Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
65 70 75 80
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Leu Ala Tyr Trp
85 90 95
Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105

<210> 38
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体的片段

<400> 38
Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala
1 5 10 15
Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Glu Thr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu
65 70 75 80

	Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Thr Leu Lys Asn Pro	
	85 90 95	
	Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
	100 105	
	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 39	
	agcgtgcgat tcaaaggatt	20
	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 40	
	gactgggtgcc gacgatgact	20
	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 41	
	gaaggtgaag gtcggagtc	19
[0010]	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 42	
	gaagatgggtg atgggatttc	20
	<210> 43	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 43	
	tgcacaggag ccaagagtga a	21
	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 44	
	cacatcacag ctccccacca	20
	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 引物	
	<400> 45 agcttgcatg tcaaaggatt	20
	<210> 46 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 46 gactgggtgt gatgatgact	20
	<210> 47 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 47 gaaggtgaag gtcggagtc	19
	<210> 48 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 48 gaagatgggtg atggggcttc	20
[0011]	<210> 49 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 49 tgcacaggag ccaagagtga a	21
	<210> 50 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 50 cacatcacag ctccccacca	20
	<210> 51 <211> 534 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 人ROR1的片段	
	<400> 51 Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu Ala Ile Ala 1 5 10 15 Leu Leu Phe Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln Lys Ser Ser 20 25 30 Ser Ala Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys His Val Arg Gly Gln Asn Val 35 40 45 Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys Ala Lys Glu 50 55 60	

[0012]

Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly Glu Cys Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly Met Asp His
 85 90 95
 Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn Asn Pro Gln
 100 105 110
 Gln Trp Thr Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala Glu Leu His
 115 120 125
 His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln Glu Gln Pro
 130 135 140
 Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Ile Asn Gln Gly Asp Leu His Glu Phe
 145 150 155 160
 Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser Ser Asp Glu
 165 170 175
 Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe Leu His Ile
 180 185 190
 Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser His Phe Phe
 195 200 205
 Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly Glu Gln Leu
 210 215 220
 His Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile Tyr Ser Ala
 225 230 235 240
 Asp Tyr Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Leu Leu Pro Ile Arg Trp Met
 245 250 255
 Pro Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ser Asp Ser Asp Ile
 260 265 270
 Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Phe Gly Leu Gln
 275 280 285
 Pro Tyr Tyr Gly Phe Ser Asn Gln Glu Val Ile Glu Met Val Arg Lys
 290 295 300
 Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg Met Tyr Ser
 305 310 315 320
 Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg Pro Arg Phe
 325 330 335
 Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu Ser Ser His
 340 345 350
 Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr Gln Thr Thr
 355 360 365
 Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro Arg Tyr Pro
 370 375 380
 Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly Gln Ile Ala
 385 390 395 400
 Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe Ile Pro Ile
 405 410 415
 Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro Ala Ala His
 420 425 430
 Tyr Gln Pro Thr Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys Pro Pro Pro
 435 440 445
 Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser Thr Gly His
 450 455 460
 Val Thr Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala Asn Ile Pro
 465 470 475 480
 Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly Met Gly Ile
 485 490 495
 Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile Asp Ser Lys
 500 505 510
 Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His Thr Glu Ser
 515 520 525
 Met Ile Ser Ala Glu Leu
 530

<210> 52
 <211> 937
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 52
 Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Gln Glu Thr
 20 25 30
 Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Thr
 35 40 45
 Ser Ser Glu Ile Asp Lys Gly Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
 50 55 60
 Asn Asn Ile Thr Thr Ser Leu Gly Gln Thr Ala Glu Leu His Cys Lys
 65 70 75 80

[0013]

Val	Ser	Gly	Asn	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Arg	Trp	Phe	Lys	Asn	Asp	Ala	85	90	95
Pro	Val	Val	Gln	Glu	Pro	Arg	Arg	Ile	Ser	Phe	Arg	Ala	Thr	Asn	Tyr	100	105	110
Gly	Ser	Arg	Leu	Arg	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Thr	Thr	Asp	Thr	Gly	Tyr	115	120	125
Phe	Gln	Cys	Val	Ala	Thr	Asn	Gly	Lys	Lys	Val	Val	Ser	Thr	Thr	Gly	130	135	140
Val	Leu	Phe	Val	Lys	Phe	Gly	Pro	Pro	Pro	Thr	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	145	150	155
Ser	Asp	Glu	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Cys	Gln	Pro	Tyr	Arg	Gly	Ile	165	170	175
Ala	Cys	Ala	Arg	Phe	Ile	Gly	Asn	Arg	Thr	Val	Tyr	Met	Glu	Ser	Leu	180	185	190
His	Met	Gln	Gly	Glu	Ile	Glu	Asn	Gln	Ile	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr	Met	195	200	205
Ile	Gly	Thr	Ser	Ser	His	Leu	Ser	Asp	Lys	Cys	Ser	Gln	Phe	Ala	Ile	210	215	220
Pro	Ser	Leu	Cys	His	Tyr	Ala	Phe	Pro	Tyr	Cys	Asp	Glu	Thr	Ser	Ser	225	230	235
Val	Pro	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Cys	Arg	Asp	Glu	Cys	Glu	Val	Leu	Glu	245	250	255
Asn	Val	Leu	Cys	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ile	Phe	Ala	Arg	Ser	Asn	Pro	Met	260	265	270
Ile	Leu	Met	Arg	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Cys	Glu	Asp	Leu	Pro	Gln	Pro	275	280	285
Glu	Ser	Pro	Glu	Ala	Ala	Asn	Cys	Ile	Arg	Ile	Gly	Ile	Pro	Met	Ala	290	295	300
Asp	Pro	Ile	Asn	Lys	Asn	His	Lys	Cys	Tyr	Asn	Ser	Thr	Gly	Val	Asp	305	310	315
Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Ser	Gly	Arg	Gln	Cys	Gln	Pro	325	330	335
Trp	Asn	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Thr	His	Ser	Phe	Thr	Ala	Leu	Arg	Phe	340	345	350
Pro	Glu	Leu	Asn	Gly	Gly	His	Ser	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Gly	Asn	Gln	355	360	365
Lys	Glu	Ala	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	Ser	Asp	370	375	380
Leu	Cys	Asp	Ile	Pro	Ala	Cys	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Lys	Glu	Lys	Asn	385	390	395
Lys	Met	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Leu	Val	Pro	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Leu	405	410	415
Ala	Ile	Ala	Phe	Leu	Phe	Phe	Phe	Ile	Cys	Val	Cys	Arg	Asn	Asn	Gln	420	425	430
Lys	Ser	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	Gln	Arg	Gln	Pro	Lys	Pro	Val	Arg	Gly	435	440	445
Gln	Asn	Val	Glu	Met	Ser	Met	Leu	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Lys	Ser	Lys	450	455	460
Ala	Lys	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Val	Arg	Phe	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	465	470	475
Glu	Cys	Thr	Phe	Gly	Lys	Ile	Tyr	Lys	Gly	His	Leu	Tyr	Leu	Pro	Gly	485	490	495
Met	Asp	His	Ala	Gln	Leu	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Asn	500	505	510
Asn	Pro	Gln	Gln	Trp	Thr	Glu	Phe	Gln	Gln	Glu	Ala	Ser	Leu	Met	Ala	515	520	525
Glu	Leu	His	His	Pro	Asn	Ile	Val	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Gln	530	535	540
Glu	Gln	Pro	Val	Cys	Met	Leu	Phe	Glu	Tyr	Met	Asn	Gln	Gly	Asp	Leu	545	550	555
His	Glu	Phe	Leu	Ile	Met	Arg	Ser	Pro	His	Ser	Asp	Val	Gly	Cys	Ser	565	570	575
Ser	Asp	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Leu	Asp	His	Gly	Asp	Phe	580	585	590
Leu	His	Ile	Ala	Ile	Gln	Ile	Ala	Ala	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ser	Ser	595	600	605
His	Phe	Phe	Val	His	Lys	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Ile	Gly	610	615	620
Glu	Gln	Leu	His	Val	Lys	Ile	Ser	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Glu	Ile	625	630	635
Tyr	Ser	Ala	Asp	Tyr	Arg	Val	Gln	Ser	Lys	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ile	645	650	655
Arg	Trp	Met	Pro	Pro	Glu	Ala	Ile	Met	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ser	Ser	Asp	660	665	670
Ser	Asp	Ile	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Val	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser	Phe	675	680	685
Gly	Leu	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Ser	Asn	Gln	Glu	Val	Ile	Glu	Met			

```

        690                695                700
Val Arg Lys Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg
705                710                715                720
Met Tyr Ser Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg
        725                730                735
Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu
        740                745                750
Ser Ser His Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr
        755                760                765
Gln Thr Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro
        770                775                780
Arg Phe Pro Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly
785                790                795                800
Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Ala Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe
        805                810                815
Ile Pro Ile Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro
        820                825                830
Ala Ala His Tyr Gln Pro Ala Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys
        835                840                845
Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser
        850                855                860
Thr Gly His Val Ala Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala
865                870                875                880
Asn Val Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly
        885                890                895
Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
        900                905                910
Asp Ser Lys Gln Ser Ser Leu Leu Gly Asp Ser His Ile His Gly His
        915                920                925
Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Val
930                935

```

<210> 53
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0014]

<220>
 <223> 小鼠ROR1的片段

```

<400> 53
Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu Ala Ile Ala
1      5      10      15
Phe Leu Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln Lys Ser Ser
20      25      30
Ser Pro Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys Pro Val Arg Gly Gln Asn Val
35      40      45
Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys Ala Lys Glu
50      55      60
Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly Glu Cys Thr
65      70      75      80
Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly Met Asp His
85      90      95
Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn Asn Pro Gln
100     105     110
Gln Trp Thr Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala Glu Leu His
115     120     125
His Pro Asn Ile Val Cys Leu Gly Ala Val Thr Gln Glu Gln Pro
130     135     140
Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Met Asn Gln Gly Asp Leu His Glu Phe
145     150     155     160
Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser Ser Asp Glu
165     170     175
Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe Leu His Ile
180     185     190
Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser His Phe Phe
195     200     205
Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly Glu Gln Leu
210     215     220
His Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile Tyr Ser Ala
225     230     235     240
Asp Tyr Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Ser Leu Pro Ile Arg Trp Met
245     250     255
Pro Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ser Asp Ser Asp Ile
260     265     270
Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Phe Gly Leu Gln
275     280     285

```



```

Pro Tyr Tyr Gly Phe Ser Asn Gln Glu Val Ile Glu Met Val Arg Lys
290                295                300
Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg Met Tyr Ser
305                310                315                320
Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg Pro Arg Phe
                325                330                335
Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu Ser Ser His
                340                345                350
Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr Gln Thr Thr
                355                360                365
Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro Arg Phe Pro
                370                375                380
Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly Gln Ile Ala
385                390                395                400
Gly Phe Ile Gly Pro Ala Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe Ile Pro Ile
                405                410                415
Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro Ala Ala His
                420                425                430
Tyr Gln Pro Ala Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys Pro Pro Pro
435                440                445
Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser Thr Gly His
450                455                460
Val Ala Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala Asn Val Pro
465                470                475                480
Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly Met Gly Ile
                485                490                495
Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile Asp Ser Lys
                500                505                510
Gln Ser Ser Leu Leu Gly Asp Ser His Ile His Gly His Thr Glu Ser
515                520                525
Met Ile Ser Ala Glu Val
530

```

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0015]

<220>
 <223> 人ROR1的片段

```

<400> 54
Glu Ala Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro
1          5          10          15
Gly

```

<210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人ROR1的片段

```

<400> 55
Ile Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly
1          5          10          15

```

<210> 56
 <211> 943
 <212> PRT
 <213> 人

```

<400> 56
Met Ala Arg Gly Ser Ala Leu Pro Arg Arg Pro Leu Leu Cys Ile Pro
1          5          10          15
Ala Val Trp Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser Val Ser Arg Thr Ser
20          25          30
Gly Glu Val Glu Val Leu Asp Pro Asn Asp Pro Leu Gly Pro Leu Asp
35          40          45
Gly Gln Asp Gly Pro Ile Pro Thr Leu Lys Gly Tyr Phe Leu Asn Phe
50          55          60
Leu Glu Pro Val Asn Asn Ile Thr Ile Val Gln Gly Gln Thr Ala Ile
65          70          75          80
Leu His Cys Lys Val Ala Gly Asn Pro Pro Pro Asn Val Arg Trp Leu
85          90          95

```

[0016]

```

Lys Asn Asp Ala Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Ile Ile Ile Arg
100 105 110
Lys Thr Glu Tyr Gly Ser Arg Leu Arg Ile Gln Asp Leu Asp Thr Thr
115 120 125
Asp Thr Gly Tyr Tyr Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Met Lys Thr Ile
130 135 140
Thr Ala Thr Gly Val Leu Phe Val Arg Leu Gly Pro Thr His Ser Pro
145 150 155 160
Asn His Asn Phe Gln Asp Asp Tyr His Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro
165 170 175
Tyr Arg Gly Ile Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Ile Tyr
180 185 190
Val Asp Ser Leu Gln Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Arg Ile Thr Ala
195 200 205
Ala Phe Thr Met Ile Gly Thr Ser Thr His Leu Ser Asp Gln Cys Ser
210 215 220
Gln Phe Ala Ile Pro Ser Phe Cys His Phe Val Phe Pro Leu Cys Asp
225 230 235 240
Ala Arg Ser Arg Thr Pro Lys Pro Arg Glu Leu Cys Arg Asp Glu Cys
245 250 255
Glu Val Leu Glu Ser Asp Leu Cys Arg Gln Glu Tyr Thr Ile Ala Arg
260 265 270
Ser Asn Pro Leu Ile Leu Met Arg Leu Gln Leu Pro Lys Cys Glu Ala
275 280 285
Leu Pro Met Pro Glu Ser Pro Asp Ala Ala Asn Cys Met Arg Ile Gly
290 295 300
Ile Pro Ala Glu Arg Leu Gly Arg Tyr His Gln Cys Tyr Asn Gly Ser
305 310 315 320
Gly Met Asp Tyr Arg Gly Thr Ala Ser Thr Thr Lys Ser Gly His Gln
325 330 335
Cys Gln Pro Trp Ala Leu Gln His Pro His Ser His His Leu Ser Ser
340 345 350
Thr Asp Phe Pro Glu Leu Gly Gly Gly His Ala Tyr Cys Arg Asn Pro
355 360 365
Gly Gly Gln Met Glu Gly Pro Trp Cys Phe Thr Gln Asn Lys Asn Val
370 375 380
Arg Met Glu Leu Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Pro Arg Asp Ser Ser
385 390 395 400
Lys Met Gly Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Ile Ala Ile Pro Leu
405 410 415
Val Ile Ala Cys Leu Phe Phe Leu Val Cys Met Cys Arg Asn Lys Gln
420 425 430
Lys Ala Ser Ala Ser Thr Pro Gln Arg Arg Gln Leu Met Ala Ser Pro
435 440 445
Ser Gln Asp Met Glu Met Pro Leu Ile Asn Gln His Lys Gln Ala Lys
450 455 460
Leu Lys Glu Ile Ser Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
465 470 475 480
Glu Asp Arg Phe Gly Lys Val Tyr Lys Gly His Leu Phe Gly Pro Ala
485 490 495
Pro Gly Glu Gln Thr Gln Ala Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Lys
500 505 510
Ala Glu Gly Pro Leu Arg Glu Glu Phe Arg His Glu Ala Met Leu Arg
515 520 525
Ala Arg Leu Gln His Pro Asn Val Val Cys Leu Leu Gly Val Val Thr
530 535 540
Lys Asp Gln Pro Leu Ser Met Ile Phe Ser Tyr Cys Ser His Gly Asp
545 550 555 560
Leu His Glu Phe Leu Val Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Ser
565 570 575
Thr Asp Asp Asp Arg Thr Val Lys Ser Ala Leu Glu Pro Pro Asp Phe
580 585 590
Val His Leu Val Ala Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
595 600 605
His His Val Val His Lys Asp Leu Ala Thr Arg Asn Val Leu Val Tyr
610 615 620
Asp Lys Leu Asn Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Phe Arg Glu Val
625 630 635 640
Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Lys Leu Leu Gly Asn Ser Leu Leu Pro Ile
645 650 655
Arg Trp Met Ala Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ile Asp
660 665 670
Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Val Leu Trp Glu Val Phe Ser Tyr
675 680 685
Gly Leu Gln Pro Tyr Cys Gly Tyr Ser Asn Gln Asp Val Val Glu Met
690 695 700
Ile Arg Asn Arg Gln Val Leu Pro Cys Pro Asp Asp Cys Pro Ala Trp

```

```

705          710          715          720
Val Tyr Ala Leu Met Ile Glu Cys Trp Asn Glu Phe Pro Ser Arg Arg
          725          730          735
Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Ser Arg Leu Arg Ala Trp Gly Asn Leu
          740          745          750
Ser Asn Tyr Asn Ser Ser Ala Gln Thr Ser Gly Ala Ser Asn Thr Thr
          755          760          765
Gln Thr Ser Ser Leu Ser Thr Ser Pro Val Ser Asn Val Ser Asn Ala
          770          775          780
Arg Tyr Val Gly Pro Lys Gln Lys Ala Pro Pro Phe Pro Gln Pro Gln
785          790          795          800
Phe Ile Pro Met Lys Gly Gln Ile Arg Pro Met Val Pro Pro Pro Gln
          805          810          815
Leu Tyr Val Pro Val Asn Gly Tyr Gln Pro Val Pro Ala Tyr Gly Ala
          820          825          830
Tyr Leu Pro Asn Phe Tyr Pro Val Gln Ile Pro Met Gln Met Ala Pro
          835          840          845
Gln Gln Val Pro Pro Gln Met Val Pro Lys Pro Ser Ser His His Ser
          850          855          860
Gly Ser Gly Ser Thr Ser Thr Gly Tyr Val Thr Thr Ala Pro Ser Asn
865          870          875          880
Thr Ser Met Ala Asp Arg Ala Ala Leu Leu Ser Glu Gly Ala Asp Asp
          885          890          895
Thr Gln Asn Ala Pro Glu Asp Gly Ala Gln Ser Thr Val Gln Glu Ala
          900          905          910
Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ser Val Pro Glu Thr Glu Leu Leu Gly Asp
          915          920          925
Cys Asp Thr Leu Gln Val Asp Glu Ala Gln Val Gln Leu Glu Ala
          930          935          940

```

<210> 57
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小鼠ROR1的片段

[0017]

```

<400> 57
Asn Pro Arg Phe Pro Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro
1          5          10          15
Gln Gly Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Ala Ile Pro
          20          25

```

<210> 58
 <211> 937
 <212> PRT
 <213> Macacca mulatta

```

<400> 58
Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Leu Leu Ala Leu
1          5          10          15
Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Glu Thr
          20          25          30
Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile
          35          40          45
Ser Ser Glu Leu Asn Lys Asp Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
          50          55          60
Asn Asn Ile Thr Thr Ser Leu Gly Gln Thr Ala Glu Leu His Cys Lys
65          70          75          80
Val Ser Gly Asn Pro Pro Thr Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
          85          90          95
Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Leu Ser Phe Arg Ser Thr Ile Tyr
          100          105          110
Gly Ser Arg Leu Arg Ile Arg Asn Leu Asp Thr Thr Asp Thr Gly Tyr
          115          120          125
Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly
          130          135          140
Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Tyr
          145          150          155          160
Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile
          165          170          175
Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu
          180          185          190
His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met
          195          200          205
Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile

```

[0018]

```

210          215          220
Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser
225          230          235          240
Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu
          245          250          255
Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met
          260          265          270
Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro
          275          280          285
Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala
          290          295          300
Asp Pro Ile Asn Lys Asn His Lys Cys Tyr Asn Ser Thr Gly Val Asp
          305          310          315          320
Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Lys Ser Gly Arg Gln Cys Gln Pro
          325          330          335
Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Thr His Thr Phe Thr Ala Leu Arg Phe
          340          345          350
Pro Glu Leu Asn Gly Gly His Ser Tyr Cys Arg Asn Pro Gly Asn Gln
          355          360          365
Lys Glu Ala Pro Trp Cys Phe Thr Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ser Asp
          370          375          380
Leu Cys Asp Ile Pro Ala Cys Asp Ser Lys Asp Ser Lys Glu Lys Asn
          385          390          395          400
Lys Met Glu Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu
          405          410          415
Ala Ile Ala Leu Leu Phe Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln
          420          425          430
Lys Ser Ser Ser Pro Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys His Val Arg Gly
          435          440          445
Gln Asn Val Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys
          450          455          460
Ala Lys Glu Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
          465          470          475          480
Glu Cys Ala Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly
          485          490          495
Met Asp His Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn
          500          505          510
Asn Pro Gln Gln Trp Thr Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala
          515          520          525
Glu Leu His His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln
          530          535          540
Glu Gln Pro Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Met Asn Gln Gly Asp Leu
          545          550          555          560
His Glu Phe Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser
          565          570          575
Ser Asp Glu Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe
          580          585          590
Leu His Ile Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
          595          600          605
His Phe Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly
          610          615          620
Glu Gln Leu His Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile
          625          630          635          640
Tyr Ser Ala Asp Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Leu Leu Pro Ile
          645          650          655
Arg Trp Met Pro Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ser Asp
          660          665          670
Ser Asp Ile Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Phe
          675          680          685
Gly Leu Gln Pro Tyr Tyr Gly Phe Ser Asn Gln Glu Val Ile Glu Met
          690          695          700
Val Arg Lys Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg
          705          710          715          720
Met Tyr Ser Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg
          725          730          735
Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu
          740          745          750
Ser Ser His Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr
          755          760          765
Gln Thr Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro
          770          775          780
Arg Tyr Pro Asn Tyr Ile Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly
          785          790          795          800
Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe
          805          810          815
Ile Pro Ile Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro
          820          825          830

```

[0019]

Ala Ala His Tyr Gln Pro Thr Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys
 835 840 845
 Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser
 850 855 860
 Thr Gly His Val Thr Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala
 865 870 875 880
 Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly
 885 890 895
 Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
 900 905 910
 Asp Ala Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His
 915 920 925
 Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Leu
 930 935

<210> 59

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 恒河猴ROR1的片段

<400> 59

Asn Pro Arg Tyr Pro Asn Tyr Ile Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro
 1 5 10 15
 Gln Gly Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro
 20 25

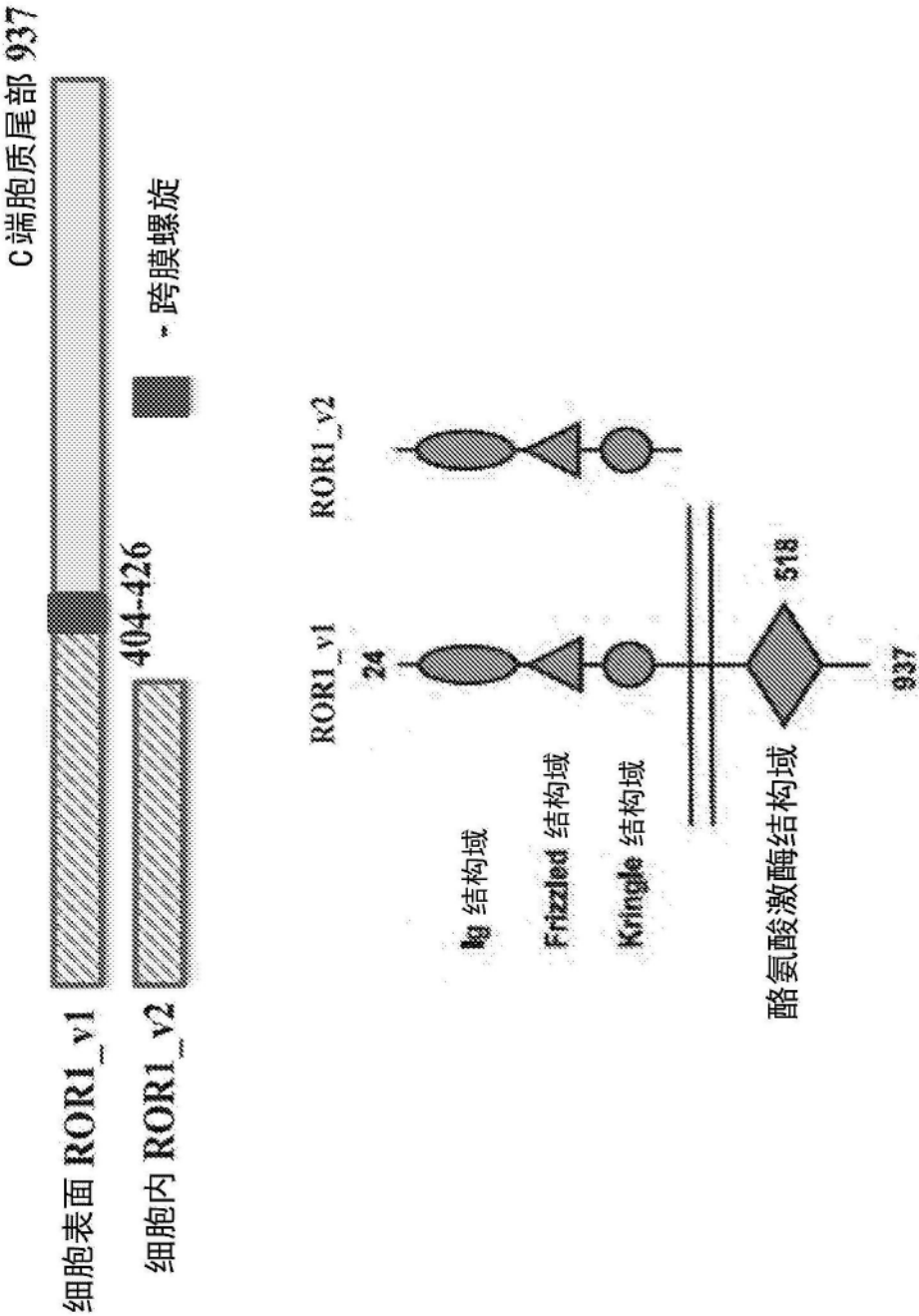


图1

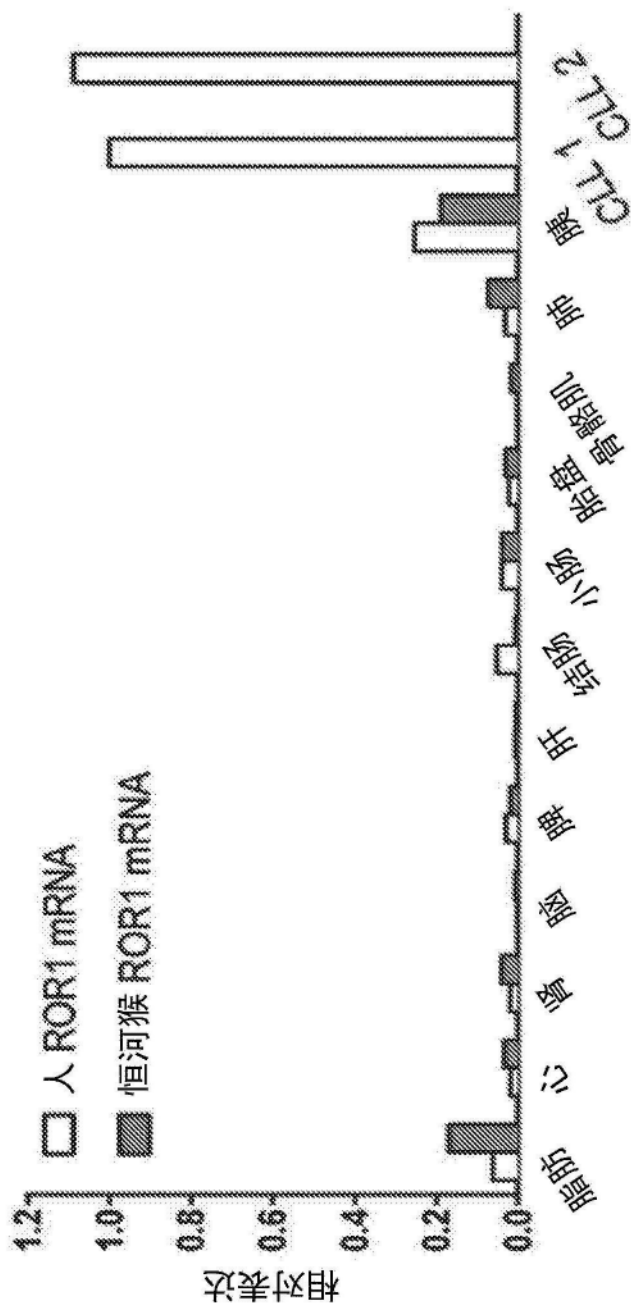


图2

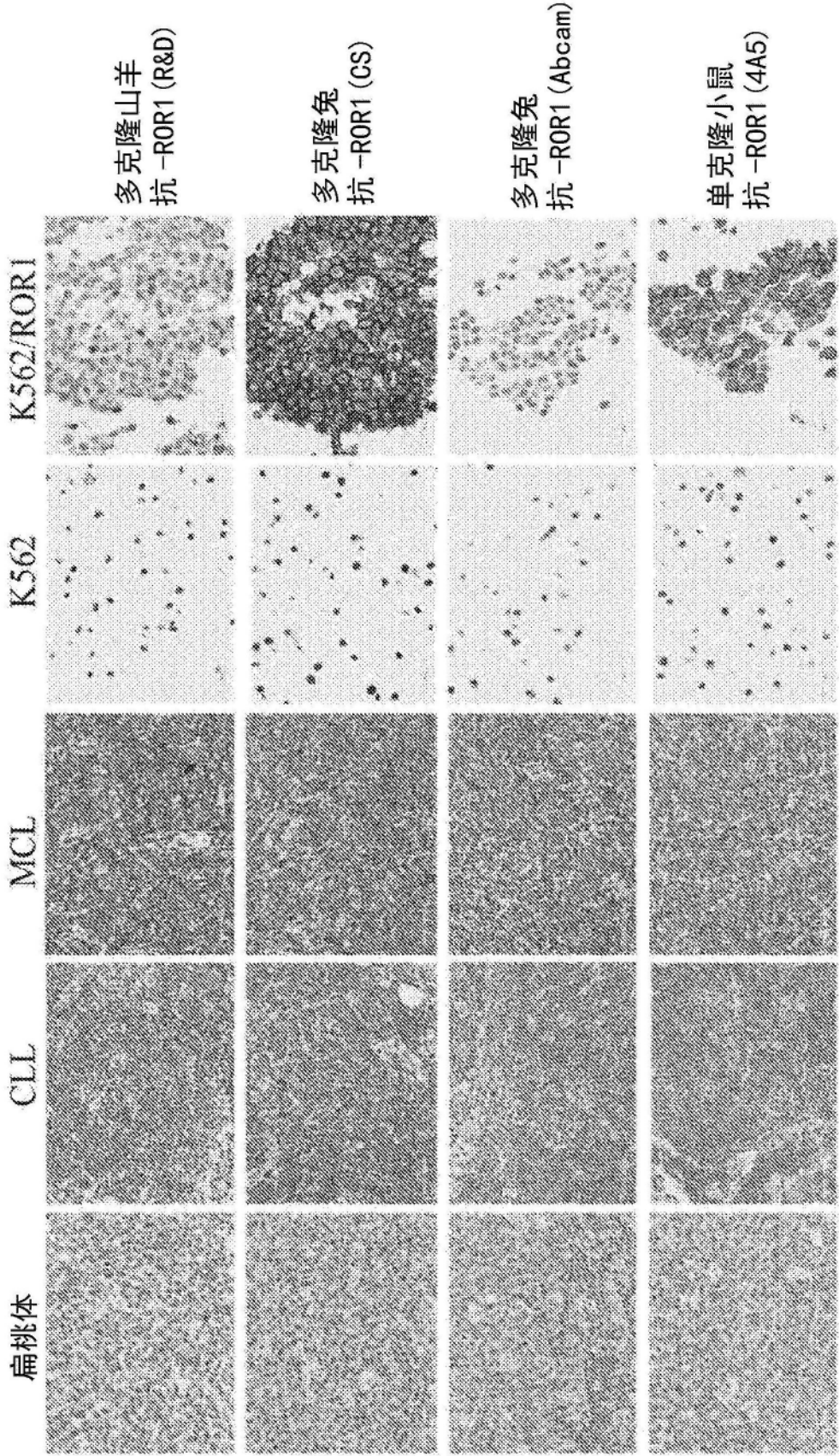


图3A

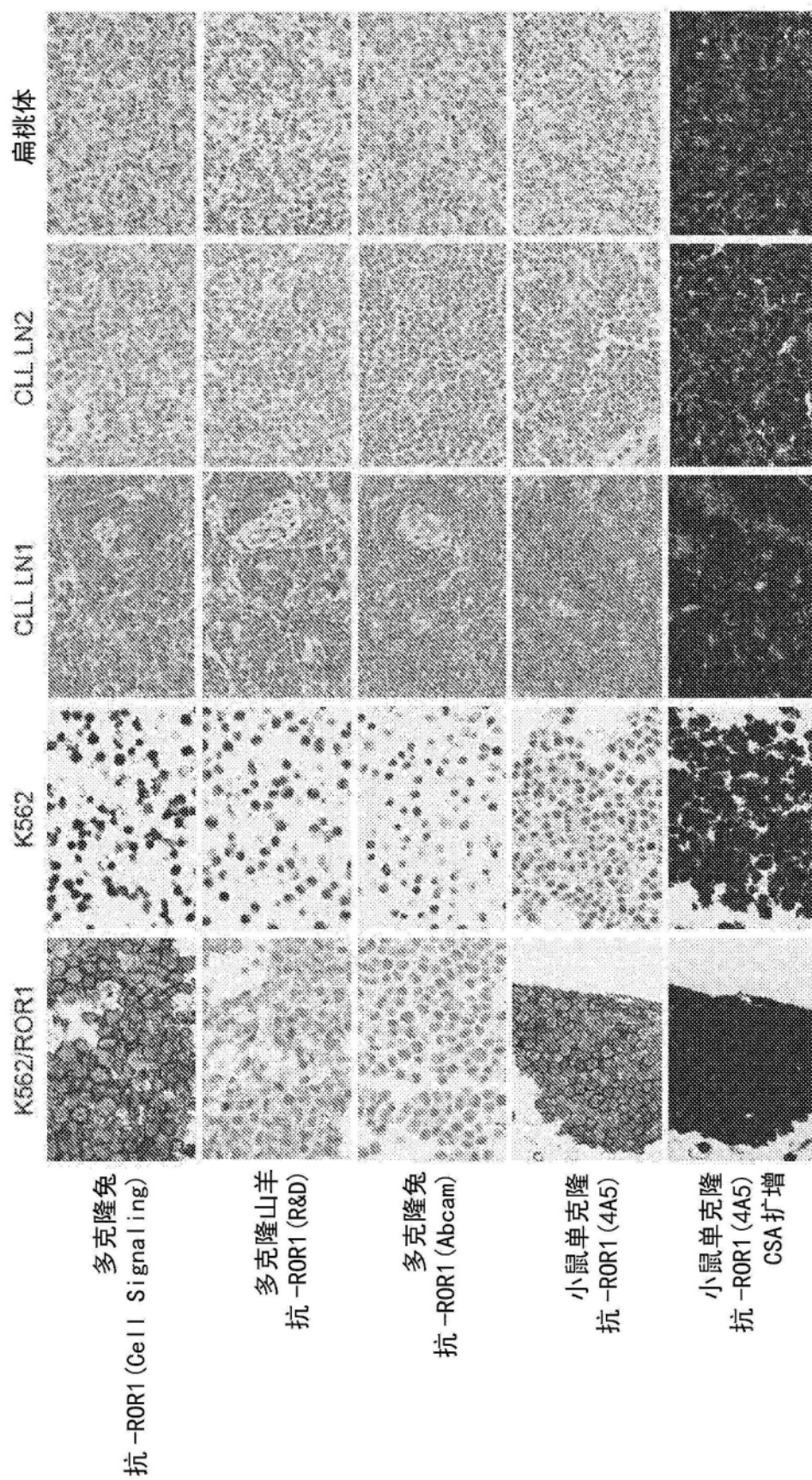


图3B

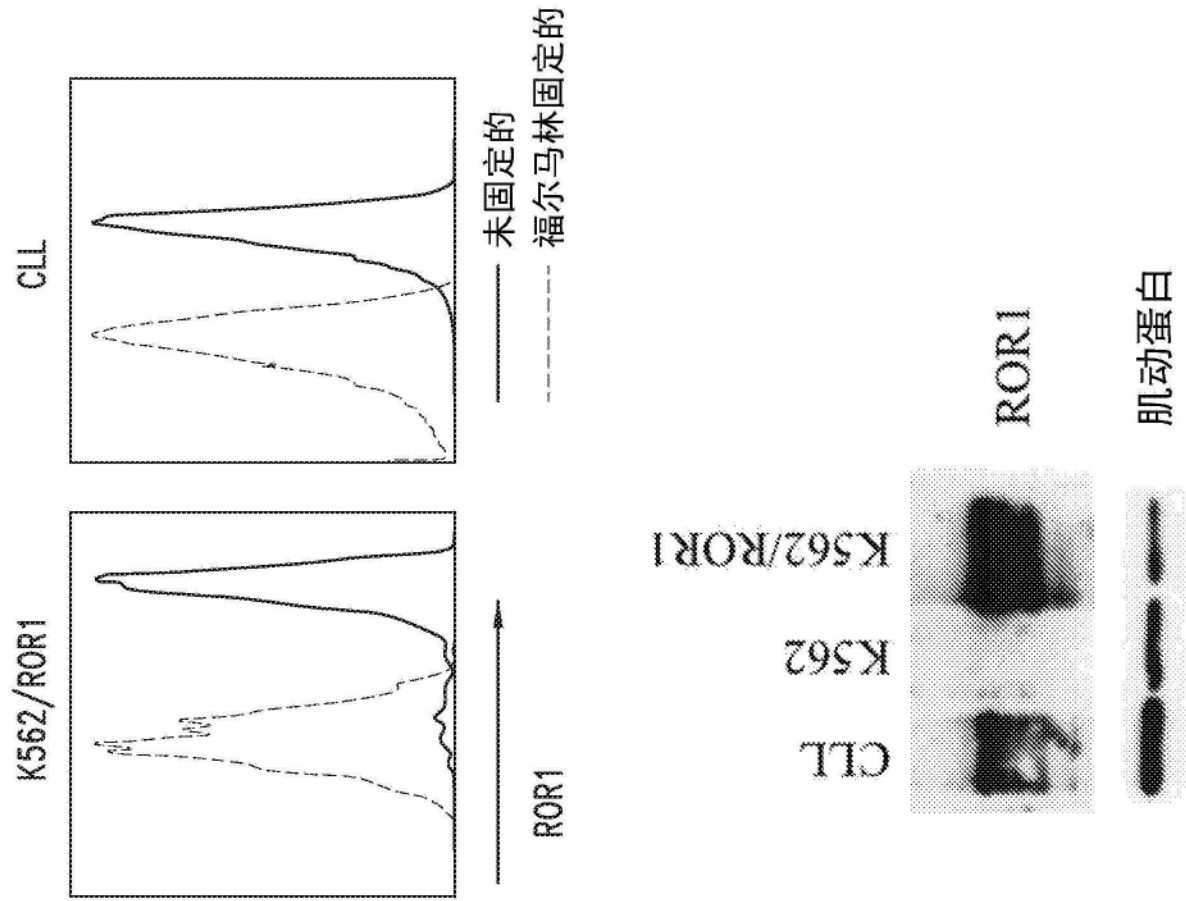


图4

AA 404

人 (SEQ ID NO.:51)
小鼠 (SEQ ID NO.:53)

```

ILYILVPSVAIPLAIALLEFFICVCRNNQKSSAPVQRPQKHVRQGVNVEHMSMLNAYKPKS
ILYILVPSVAIPLAIALLEFFICVCRNNQKSSAPVQRPQKHVRQGVNVEHMSMLNAYKPKS
*****;*****
KAKELPLSAVRFMEEELGECAPGKIYKGHLILPQMDHACLVAKTLDYNNPQQWTEFQOE
KAKELPLSAVRFMEEELGECTGKIYKGHLILPQMDHACLVAKTLDYNNPQQWTEFQOE
*****;*****
ASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLEFYINQDLHEFLIMKSPHSDVGCSSDEDGTV
ASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLEFYINQDLHEFLIMKSPHSDVGCSSDEDGTV
*****;*****
KSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSHFFVHKDLAARNILICEQLHYKISDLGLSREIYSA
KSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSHFFVHKDLAARNILICEQLHYKISDLGLSREIYSA
*****
DYRVRQSKSLPIRMWPEAIMYKFSDDSDIWSFGVLMELFSGQLPYYGFSNQEVIE
DYRVRQSKSLPIRMWPEAIMYKFSDDSDIWSFGVLMELFSGQLPYYGFSNQEVIE
*****
MVRKRQLLPCSEDCPPRMYSIMTECWNEIPSRPRPKDIHVHLKSWEGLSSTSTPSG
MVRKRQLLPCSEDCPPRMYSIMTECWNEIPSRPRPKDIHVHLKSWEGLSSTSTPSG
*****
GNATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPNMFPSQGITPQQLACIGFIPINQREIPINGYP
GNATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPNMFPSQGITPQQLACIGFIPINQREIPINGYP
*****;*****
IPPGYAAFPAAHYQPTGPRVIOHCPPPKSRPSASSGSTSTGHVTSLPSSGSGNQEANIP
IPPGYAAFPAAHYQPTGPRVIOHCPPPKSRPSASSGSTSTGHVTSLPSSGSGNQEANVE
*****;*****
LLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANINGHTESMISAEEL
LLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANINGHTESMISAEV
*****;*****

```

AA 937

图5

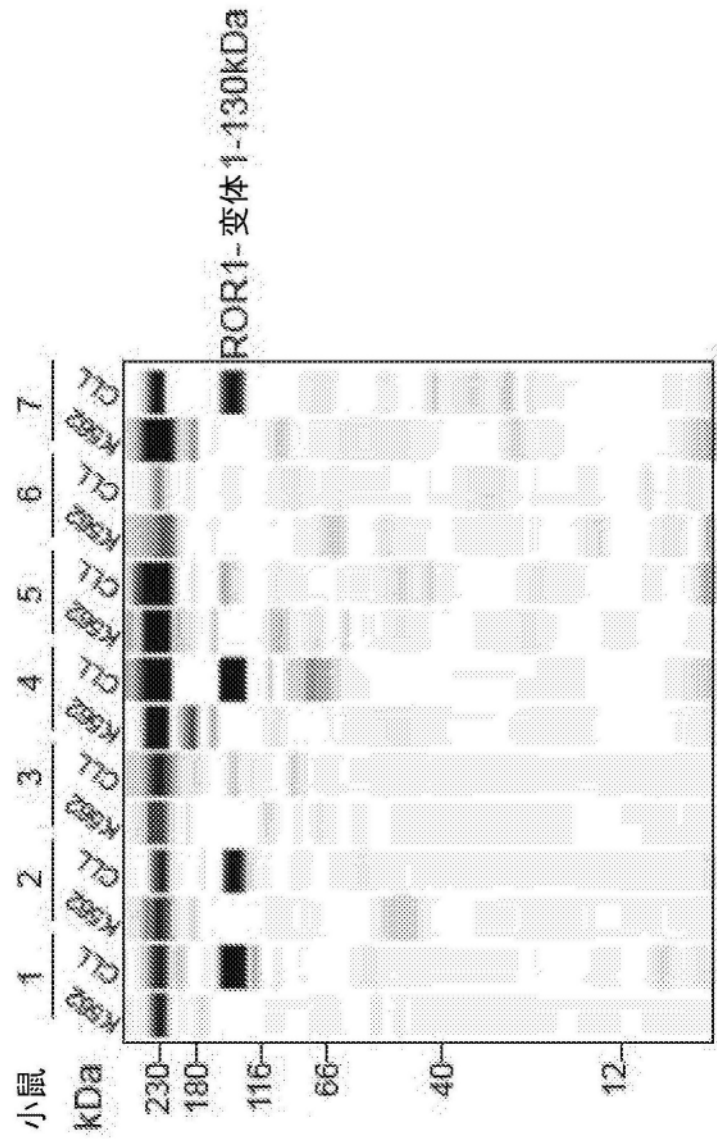


图6A

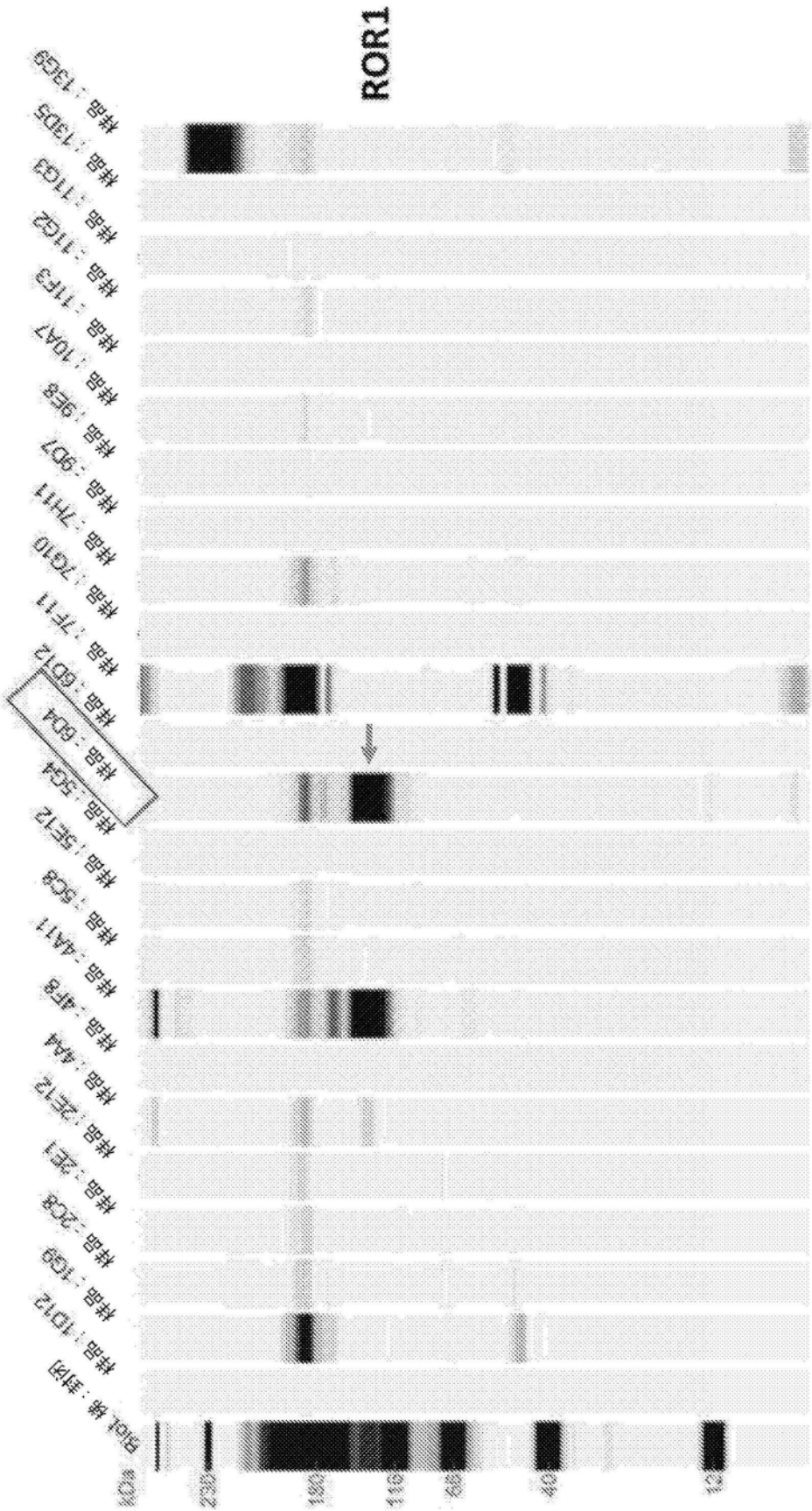


图6B

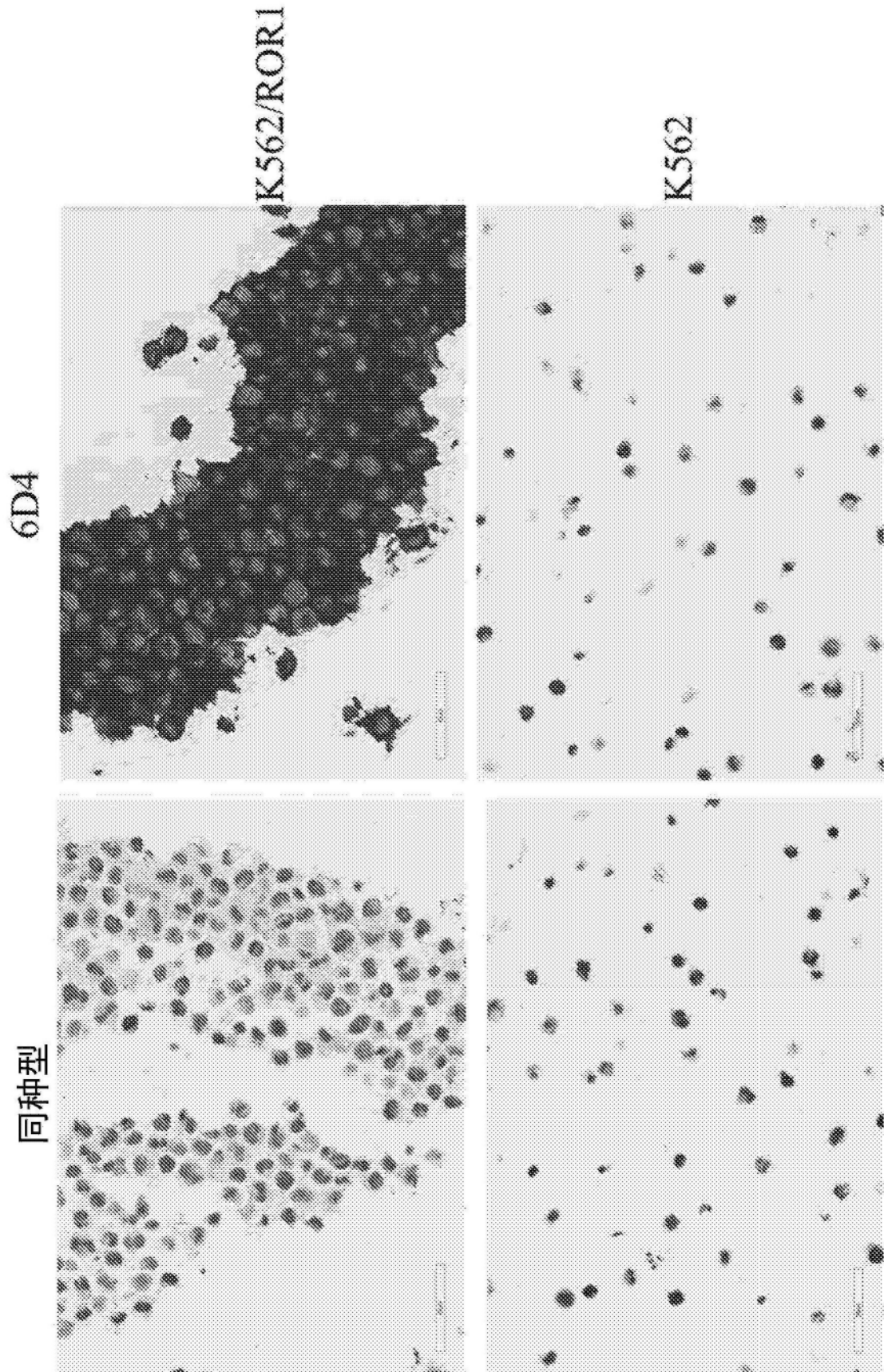


图7

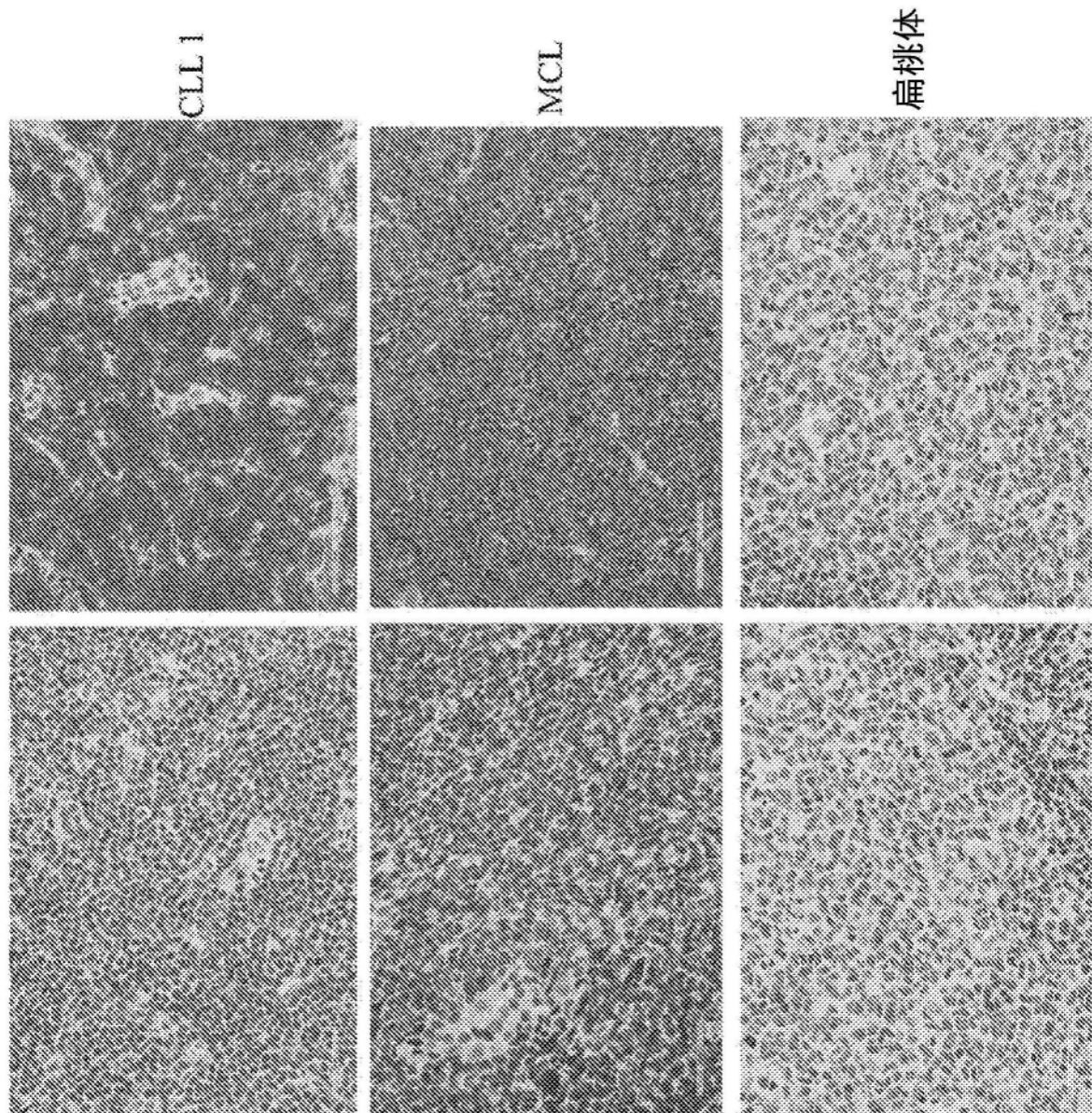


图8

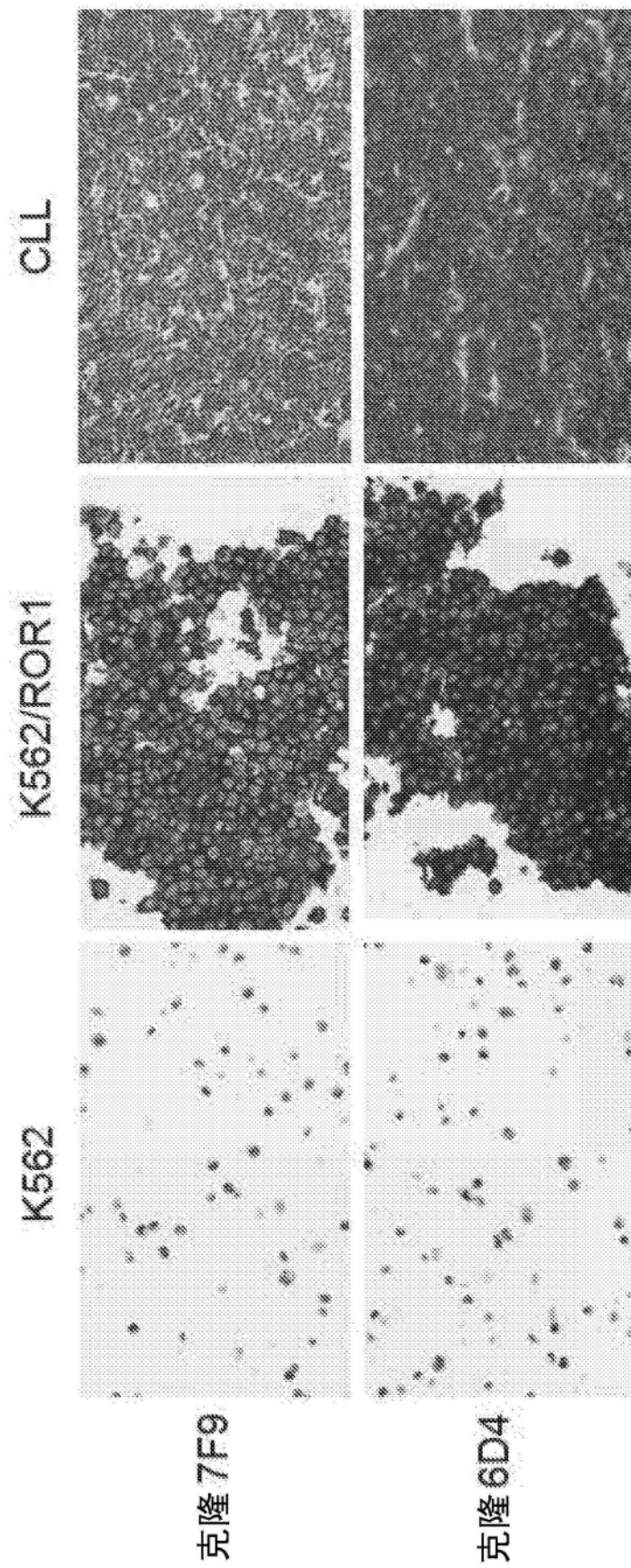


图9A

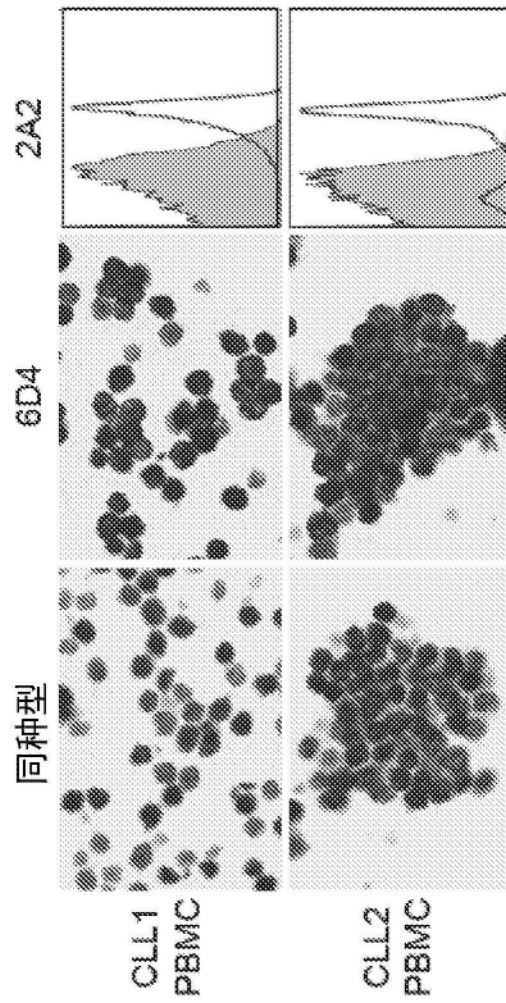


图9B

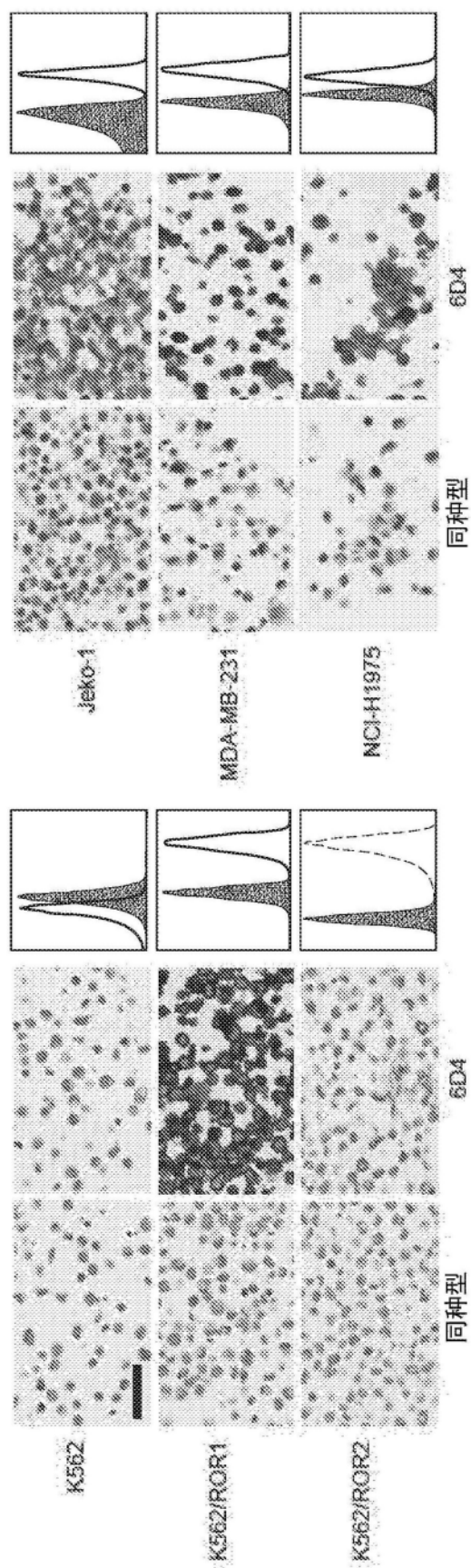


图10A

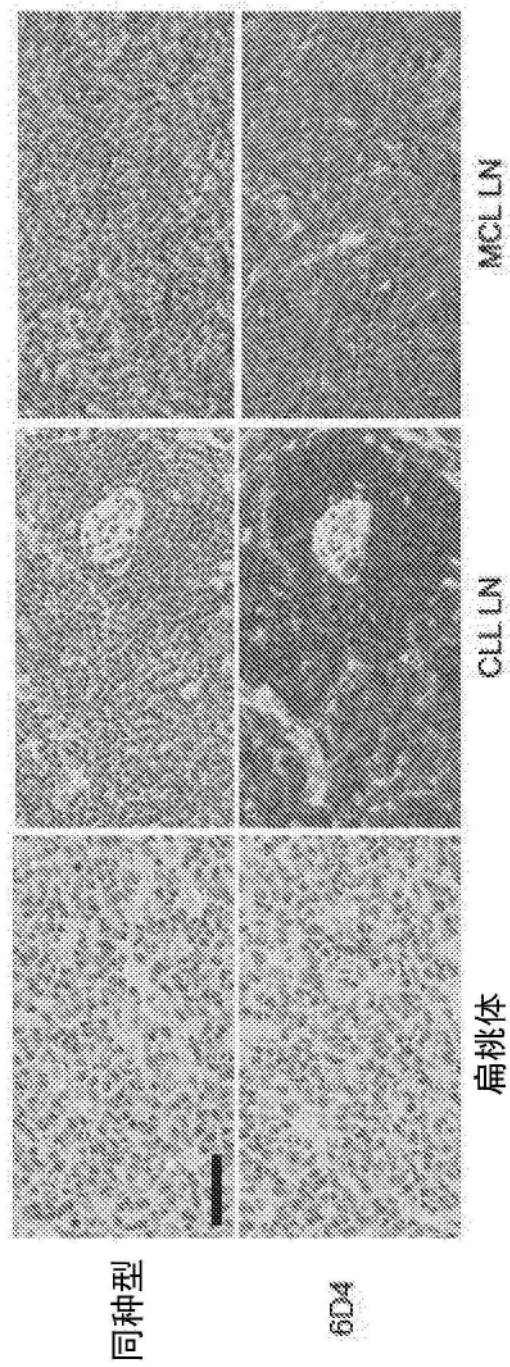


图10B

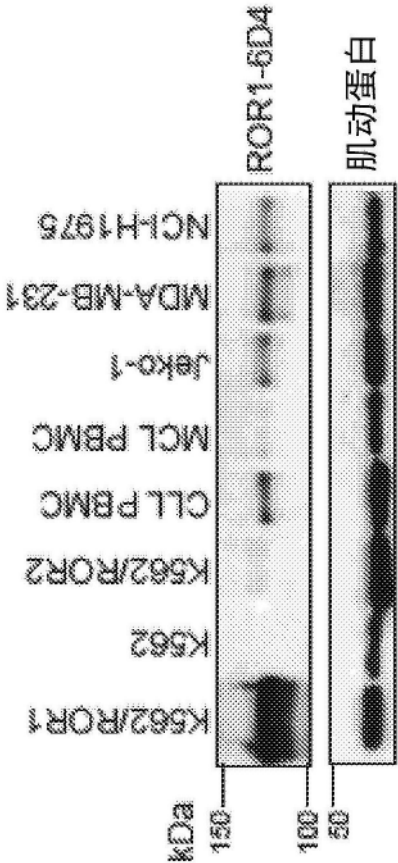


图10C

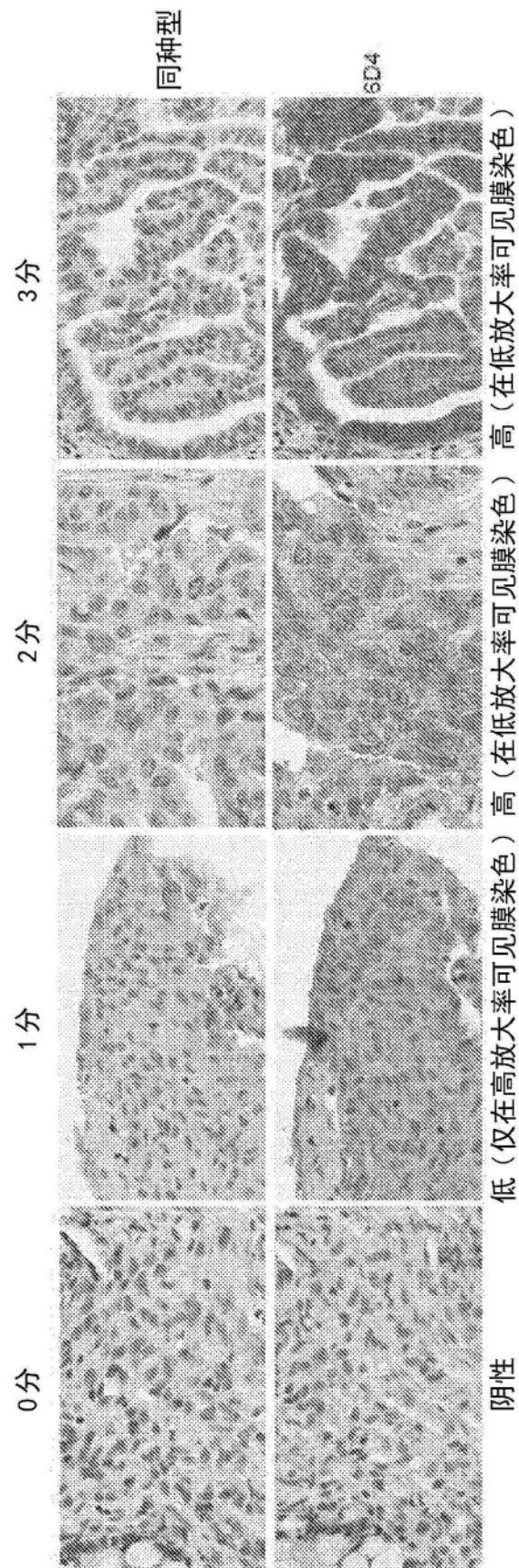


图11

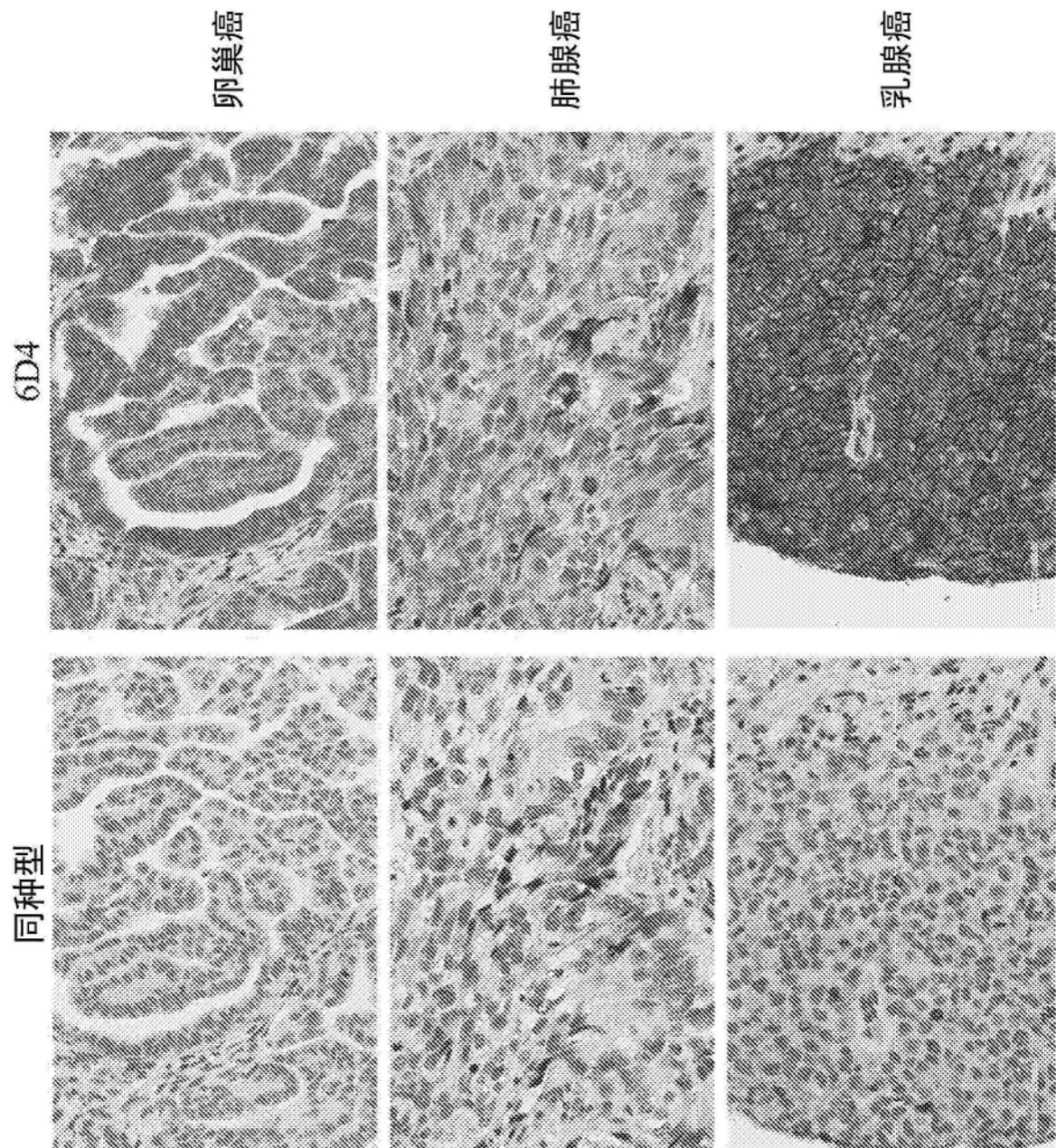


图12

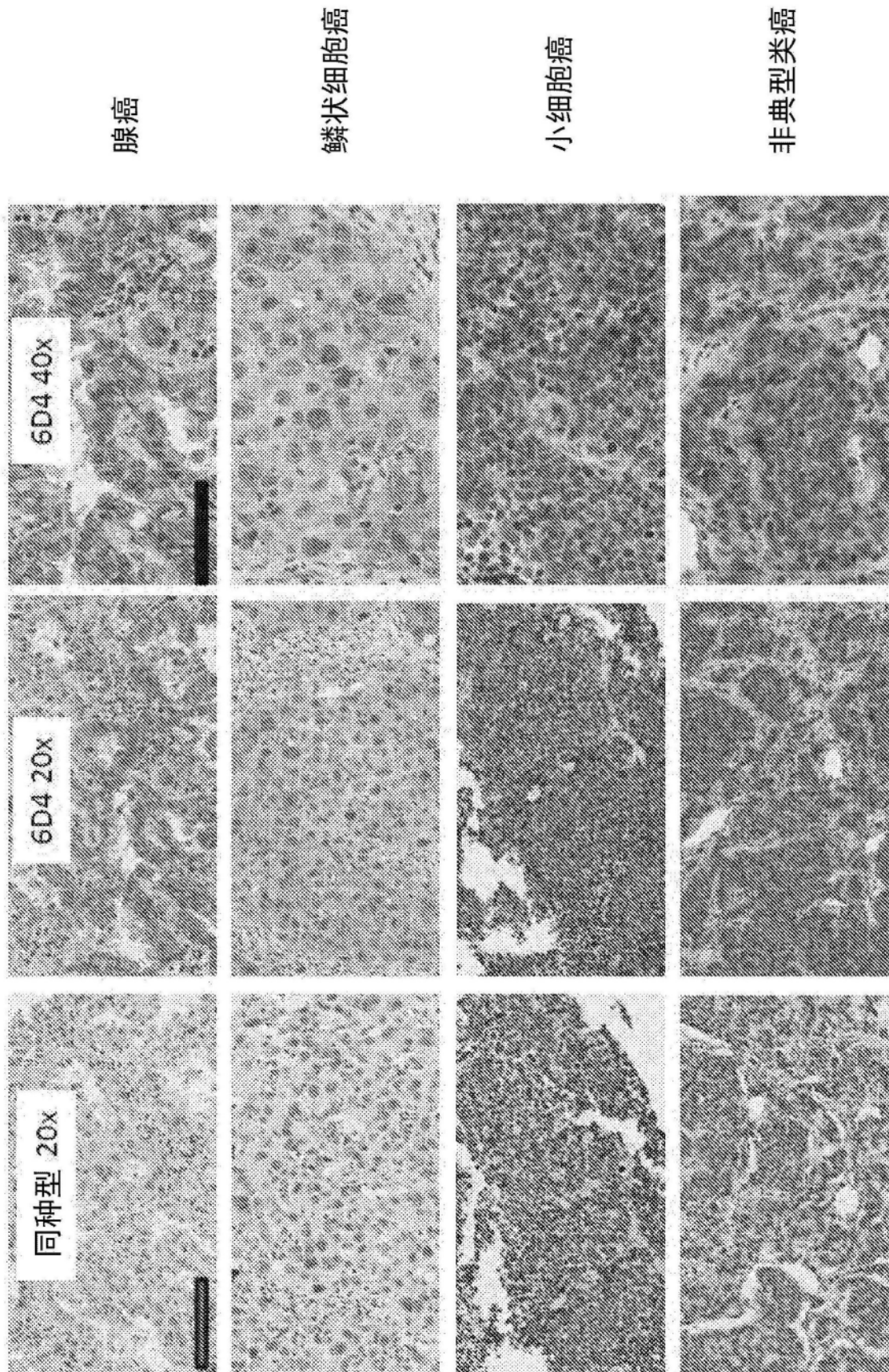


图13

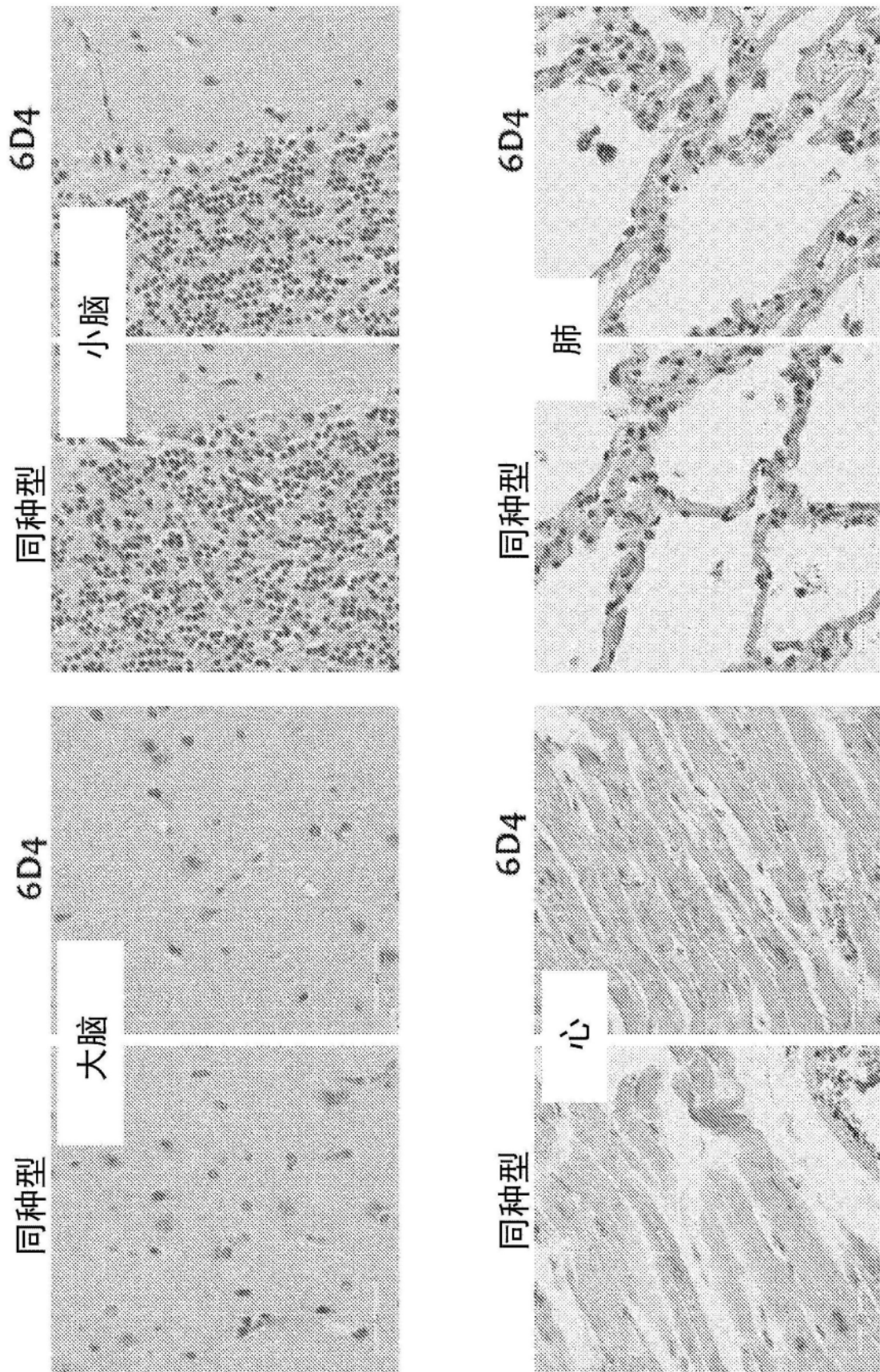


图14

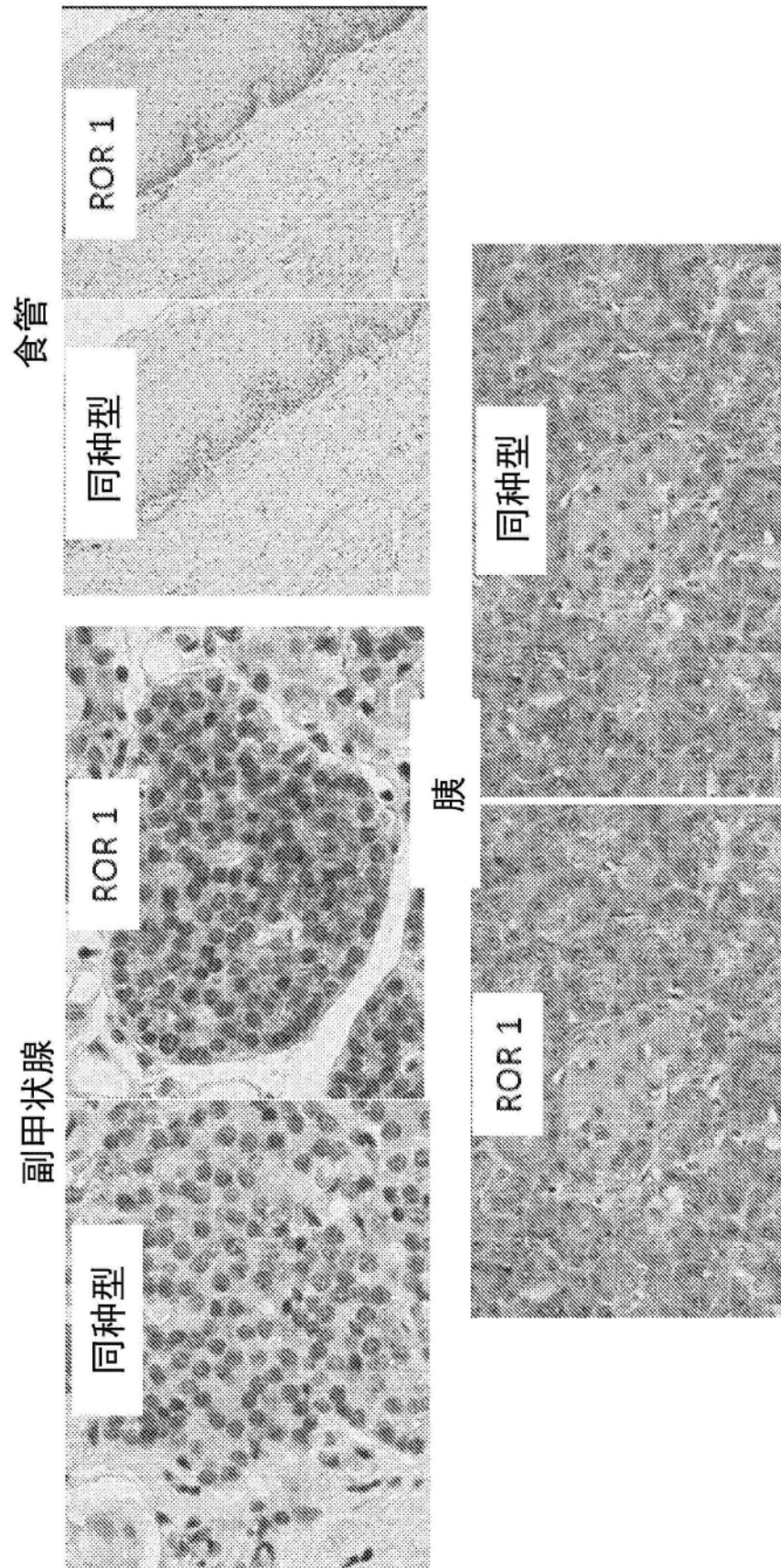


图15

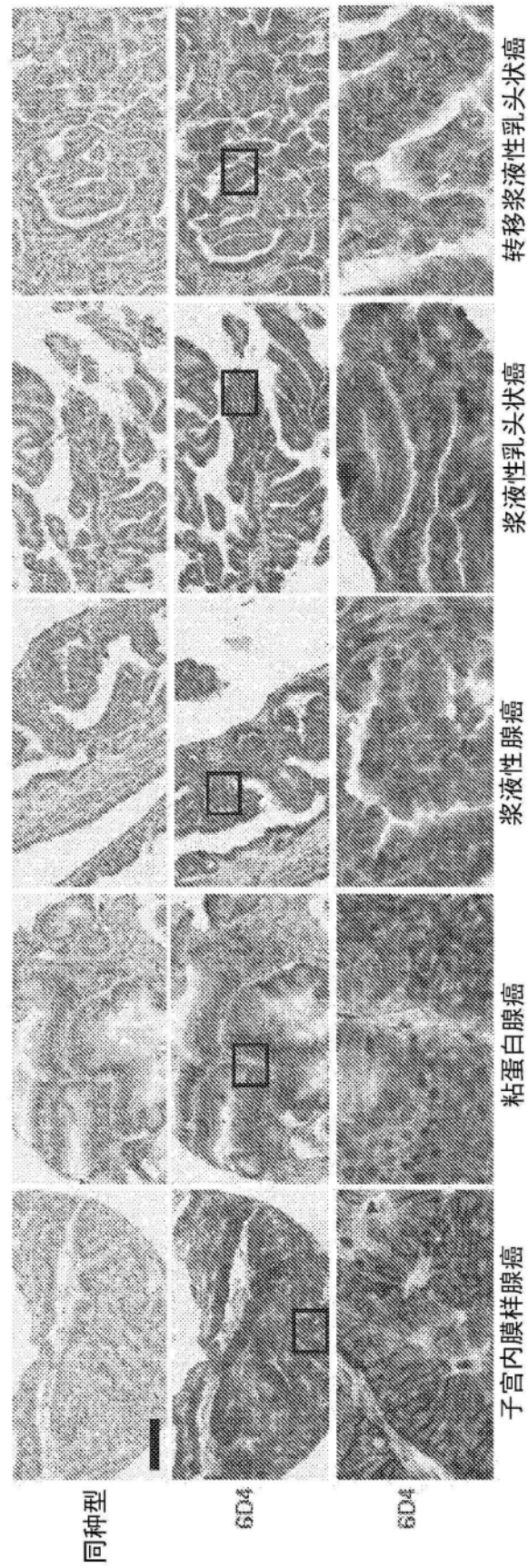


图16A

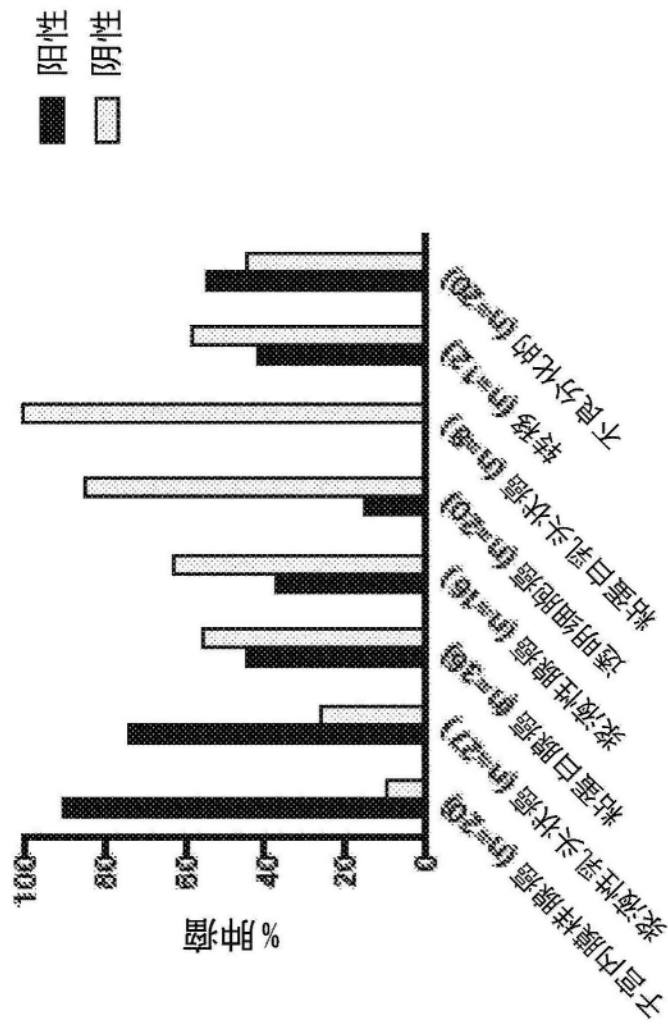


图16B

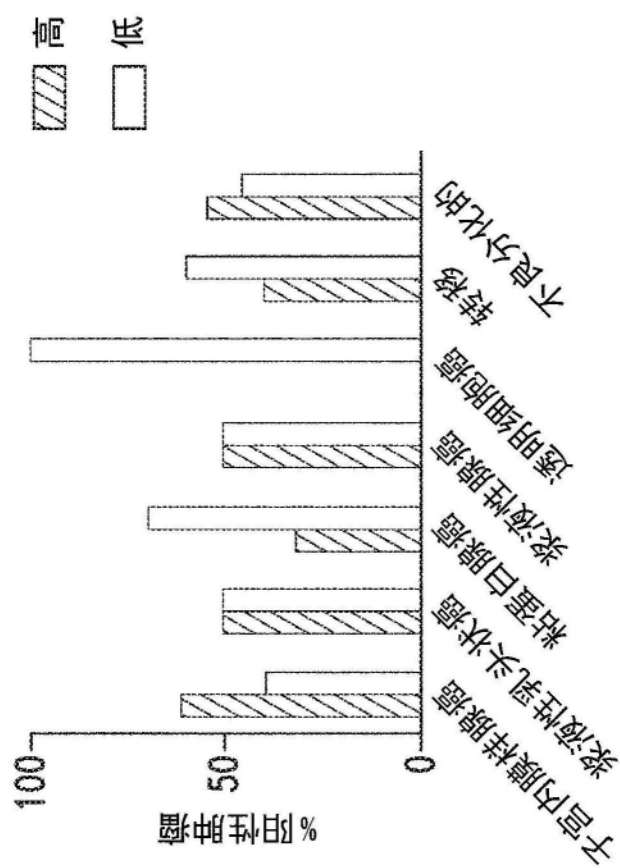


图16C

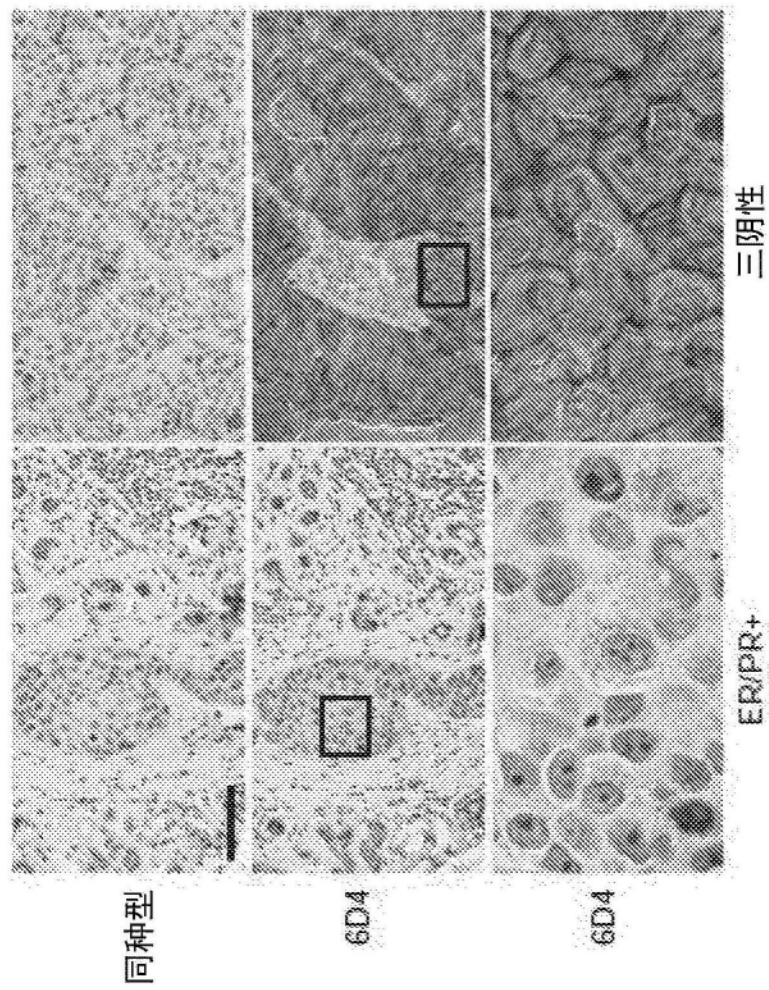


图17A

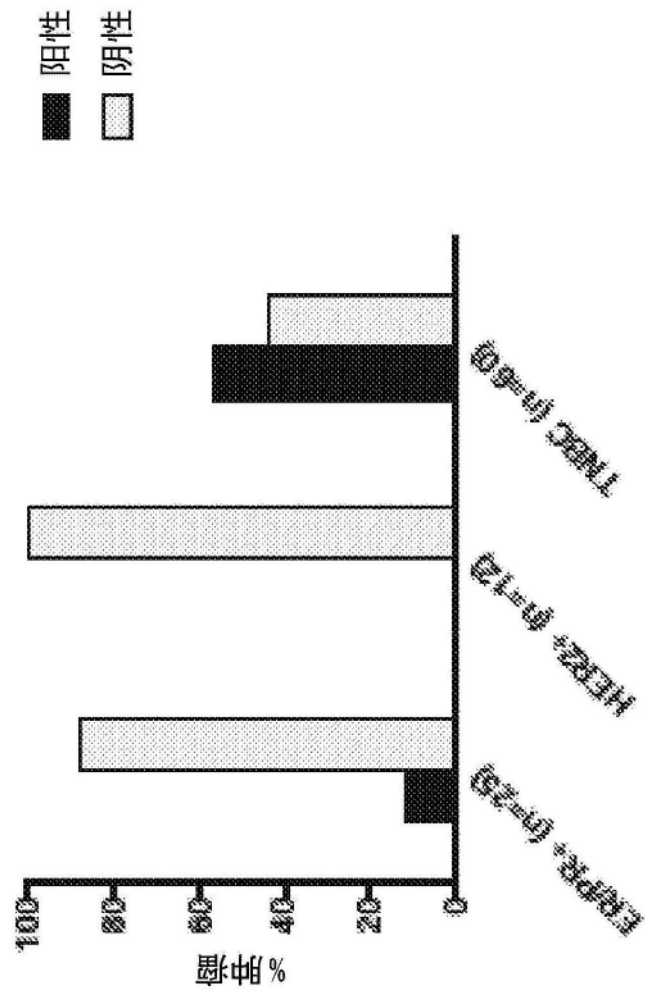


图17B

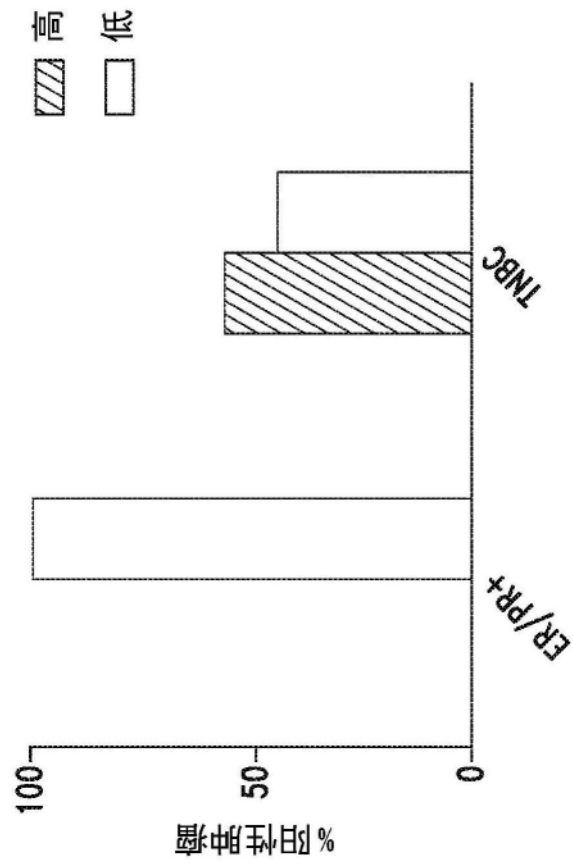


图17C

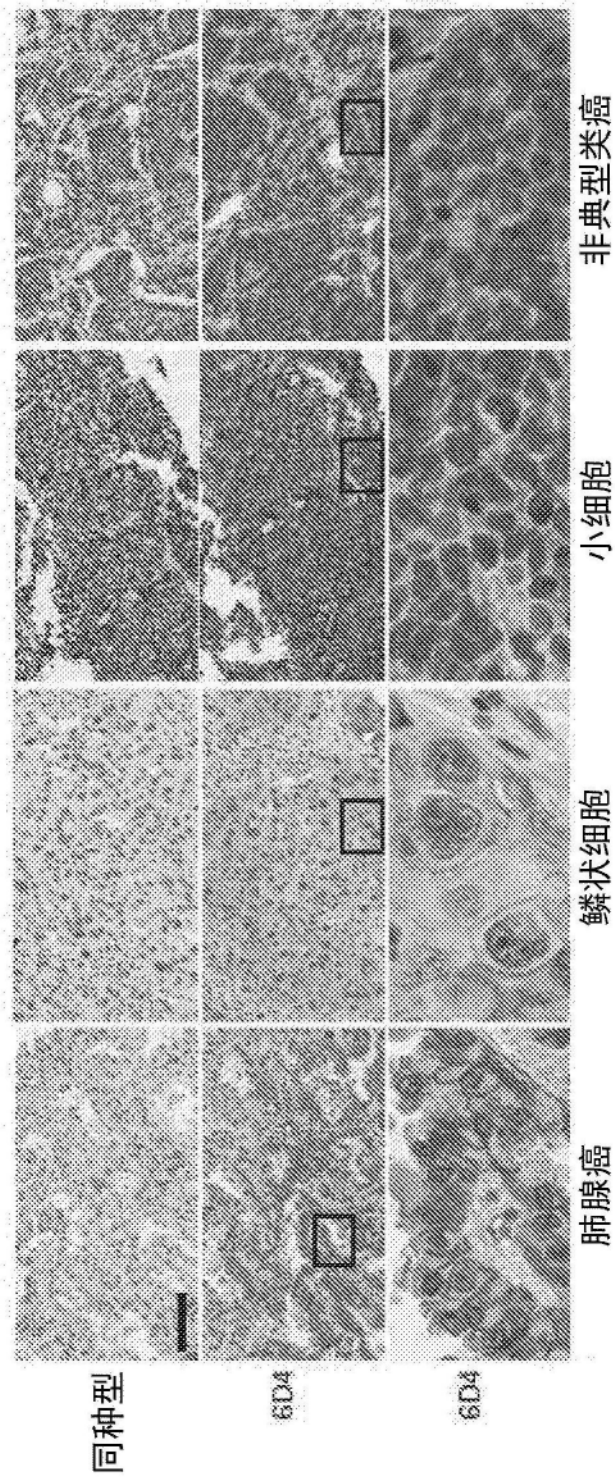


图18A

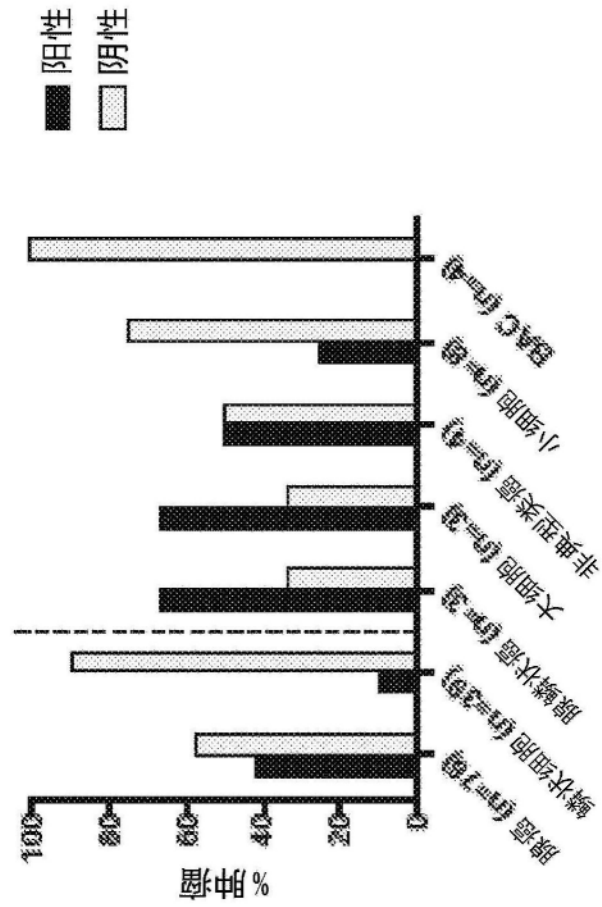


图18B

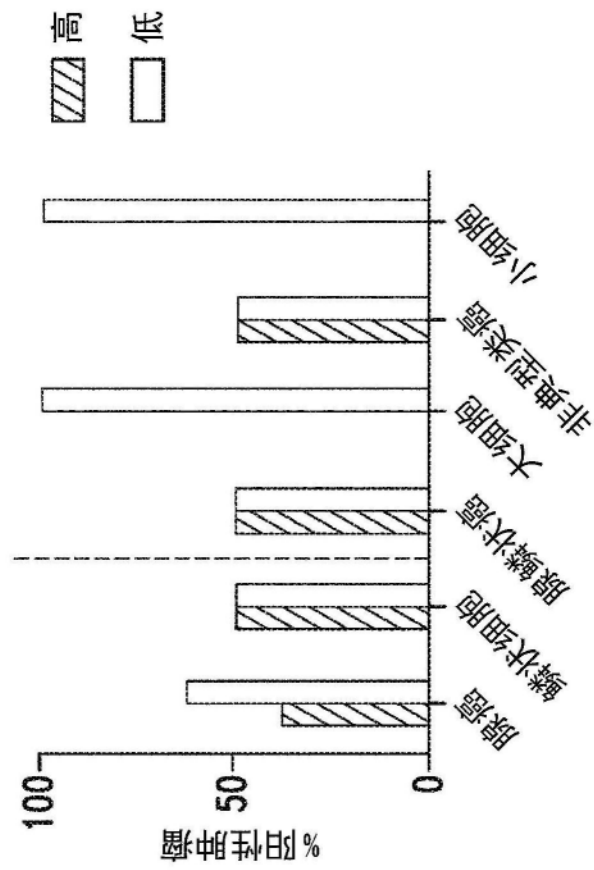


图18C

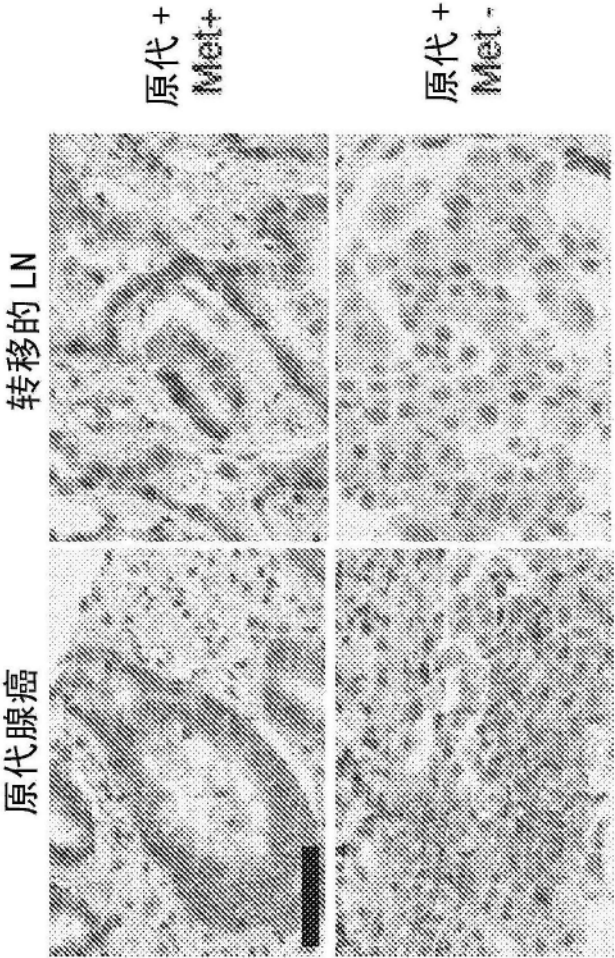


图18D

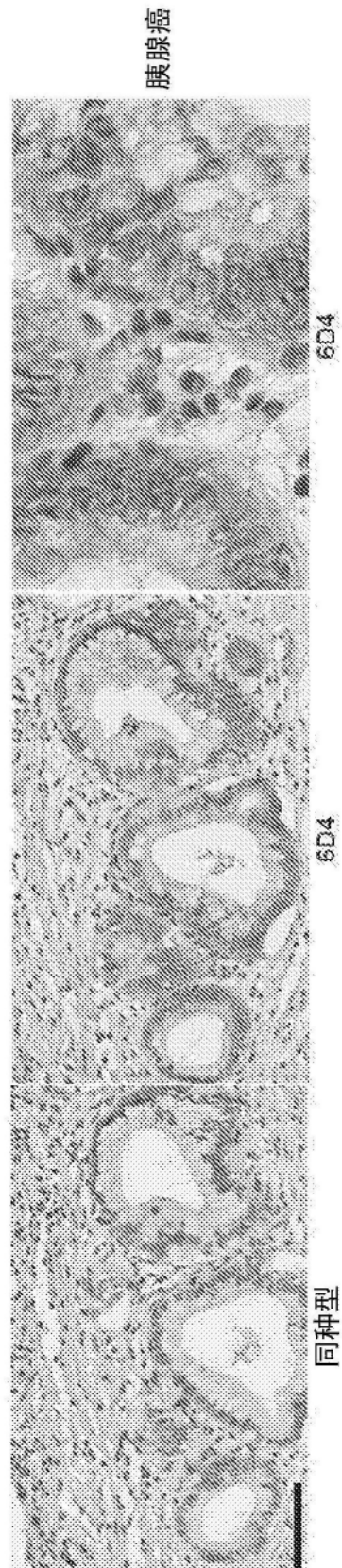


图19A

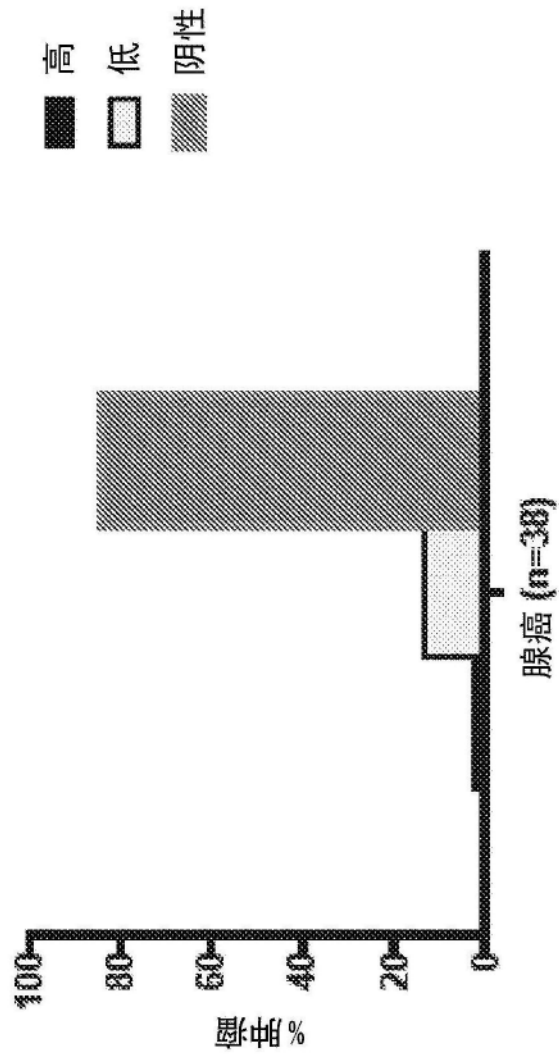


图19B

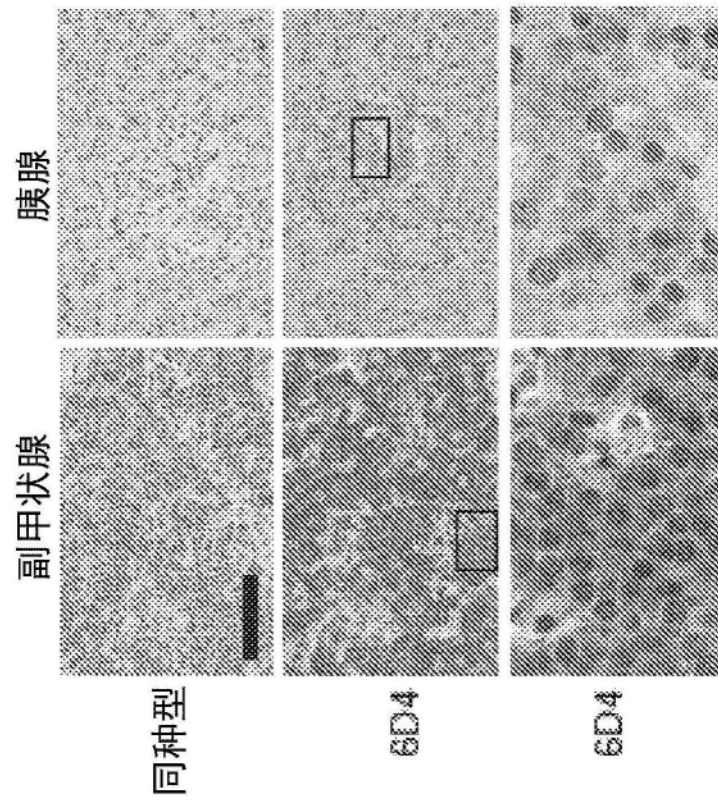


图20A

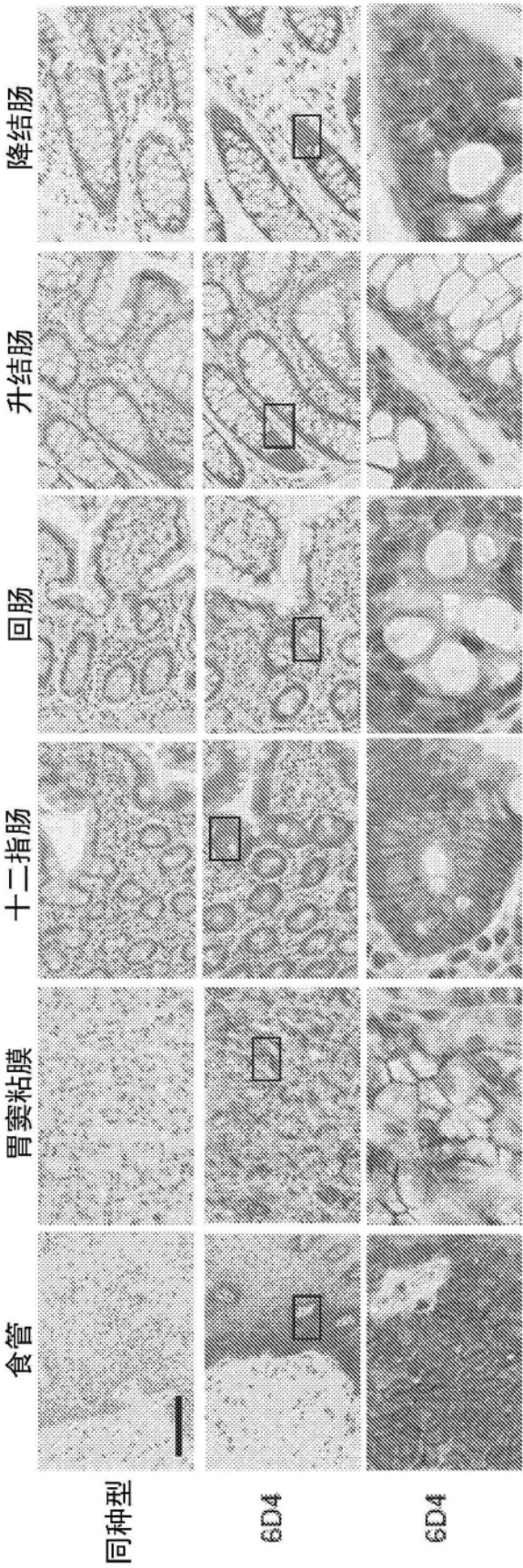


图20B

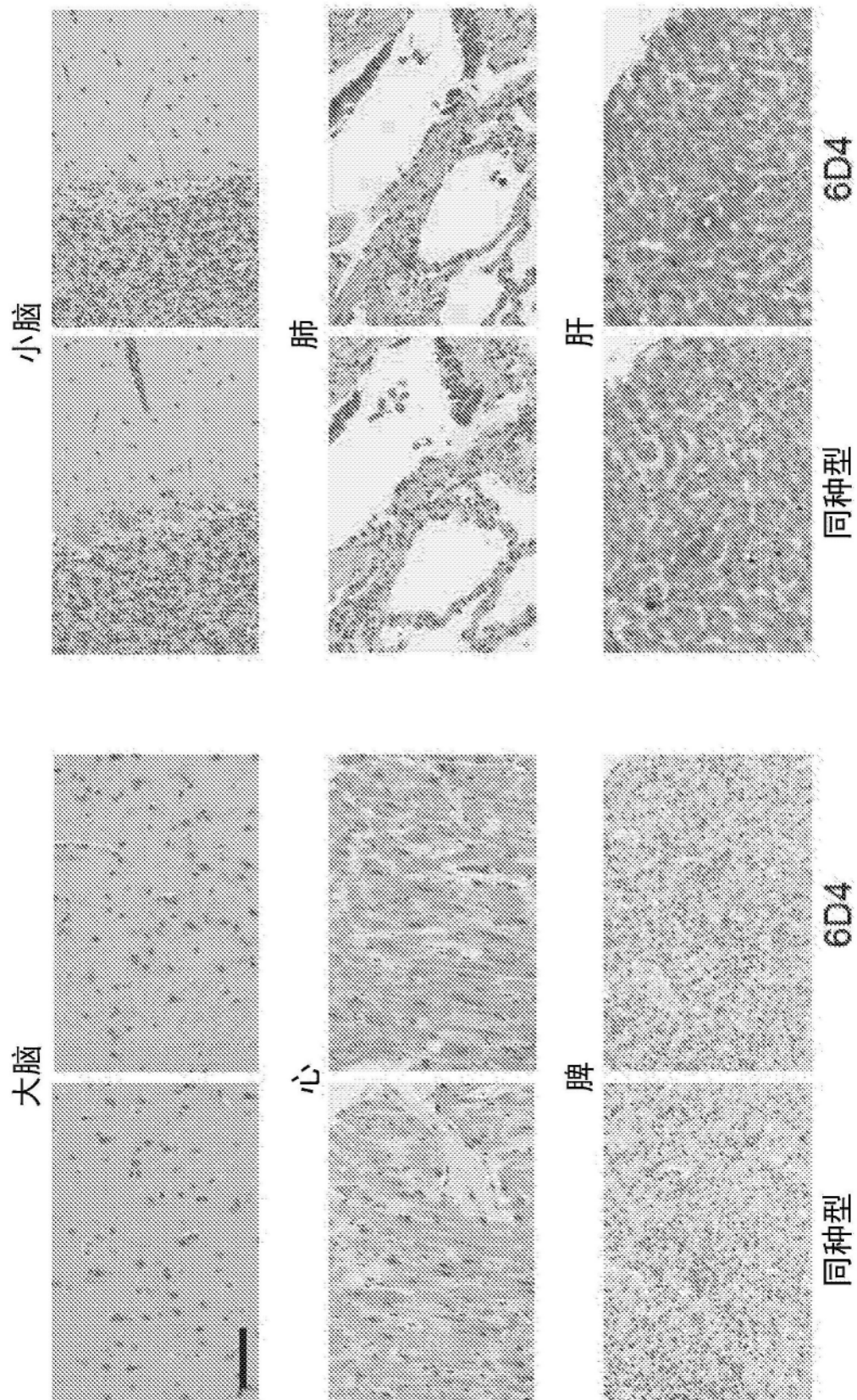


图20C

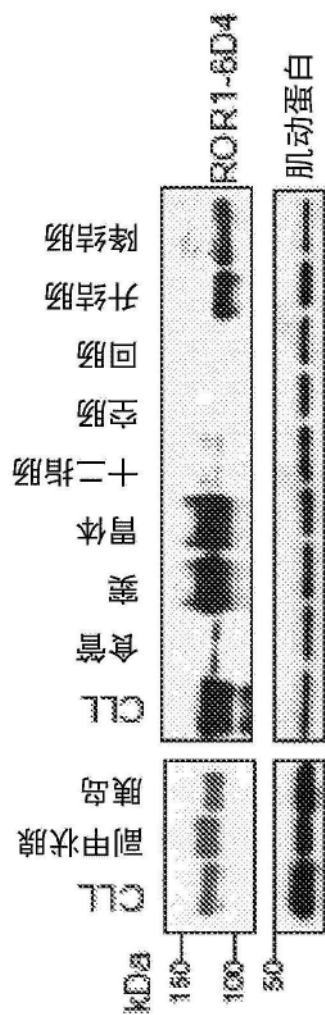


图20D

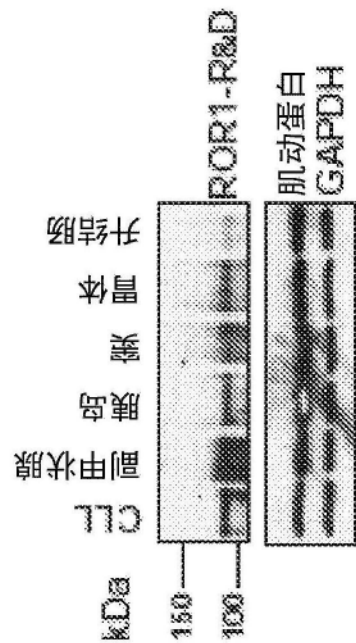


图20E

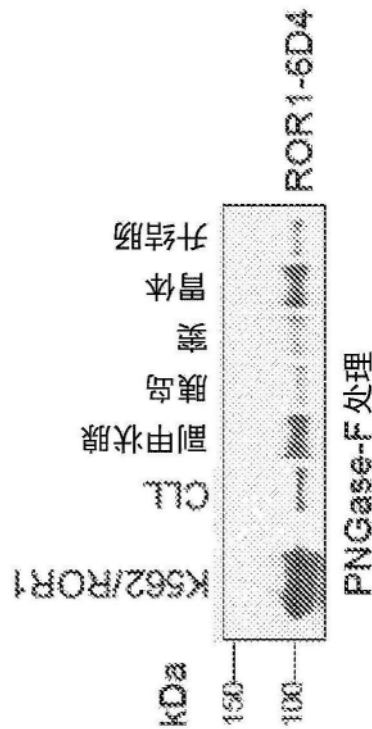


图20F

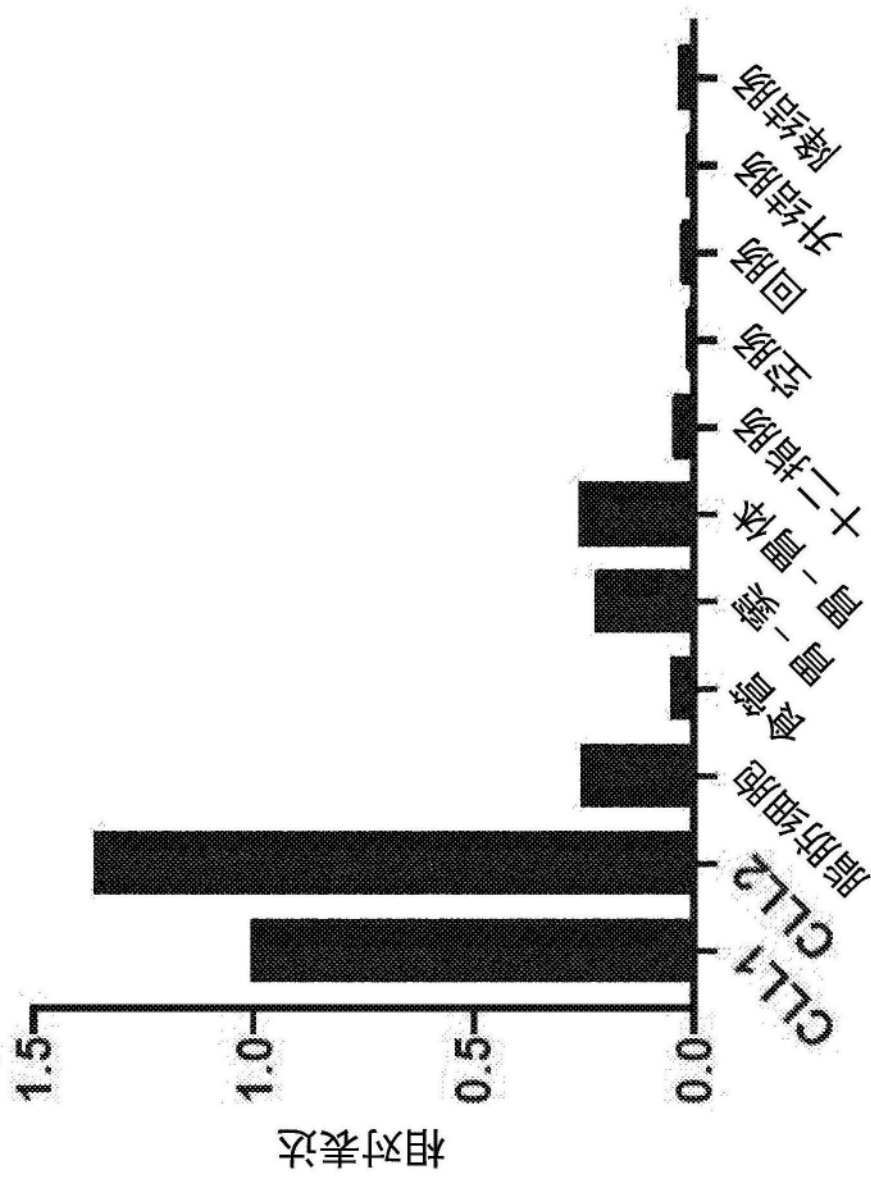


图21

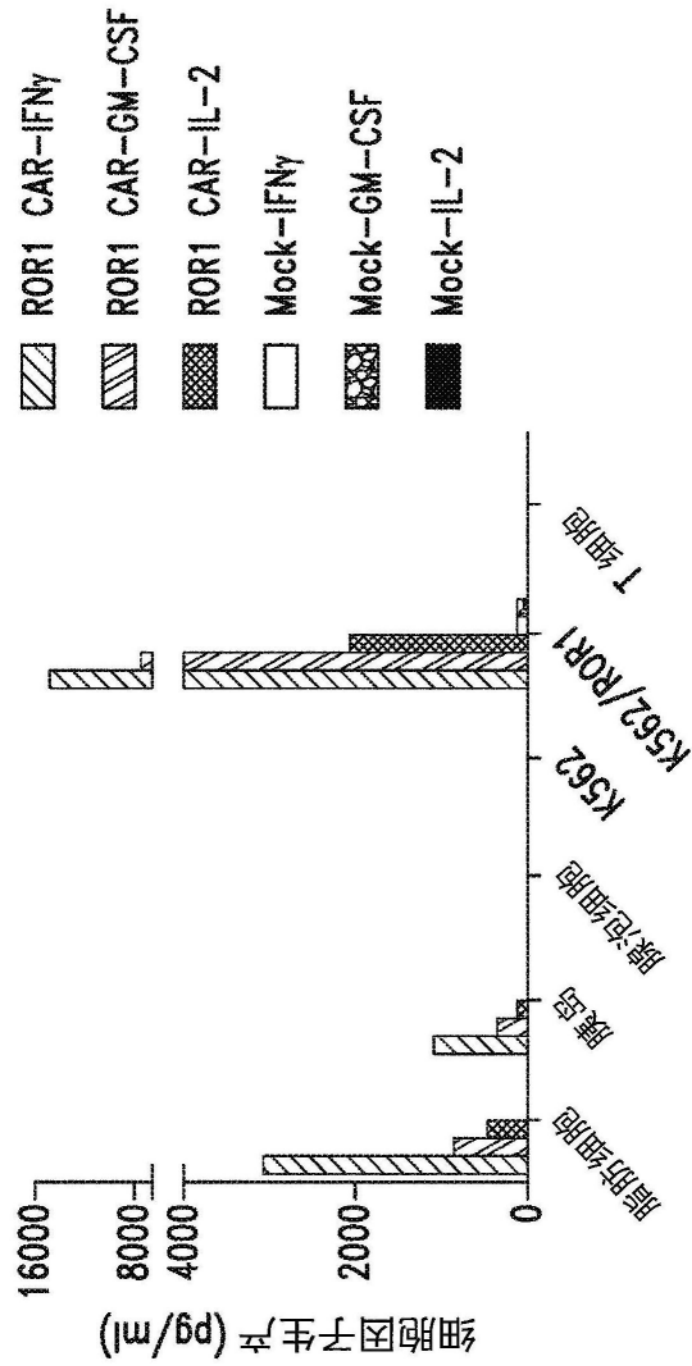


图22A

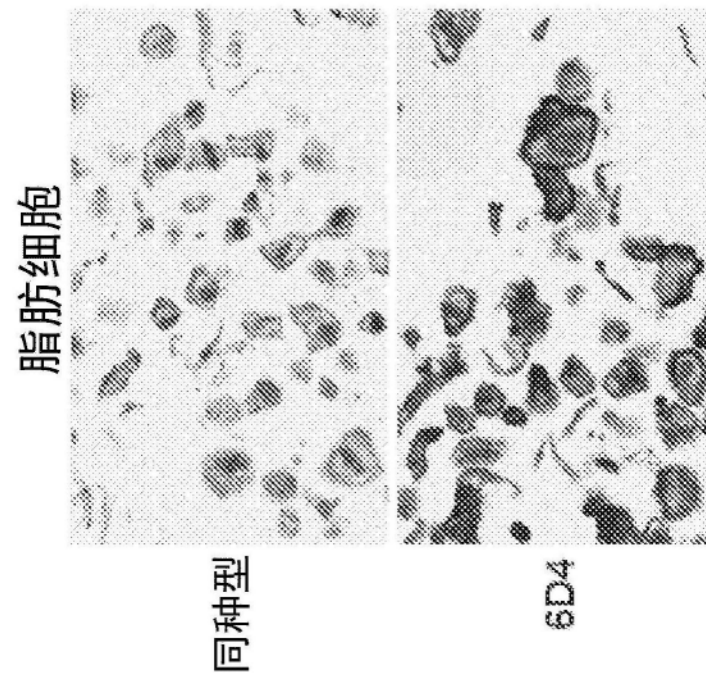


图22B

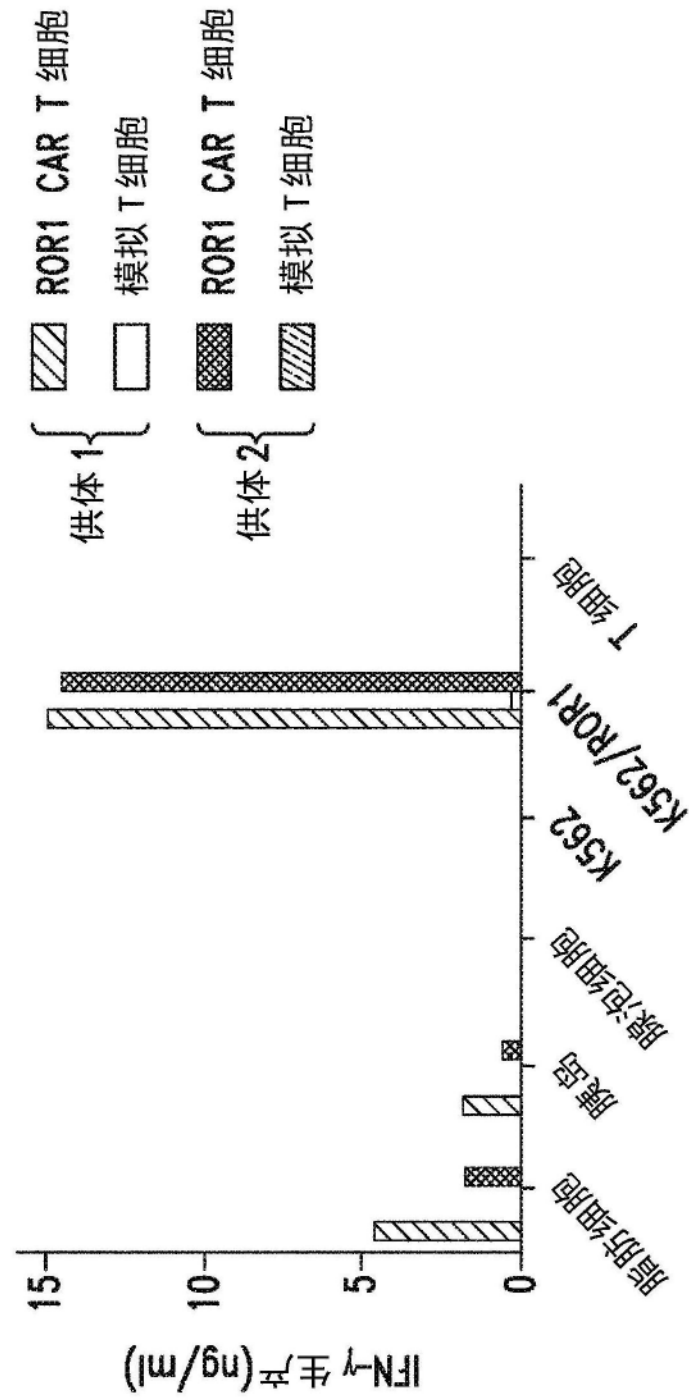


图22C

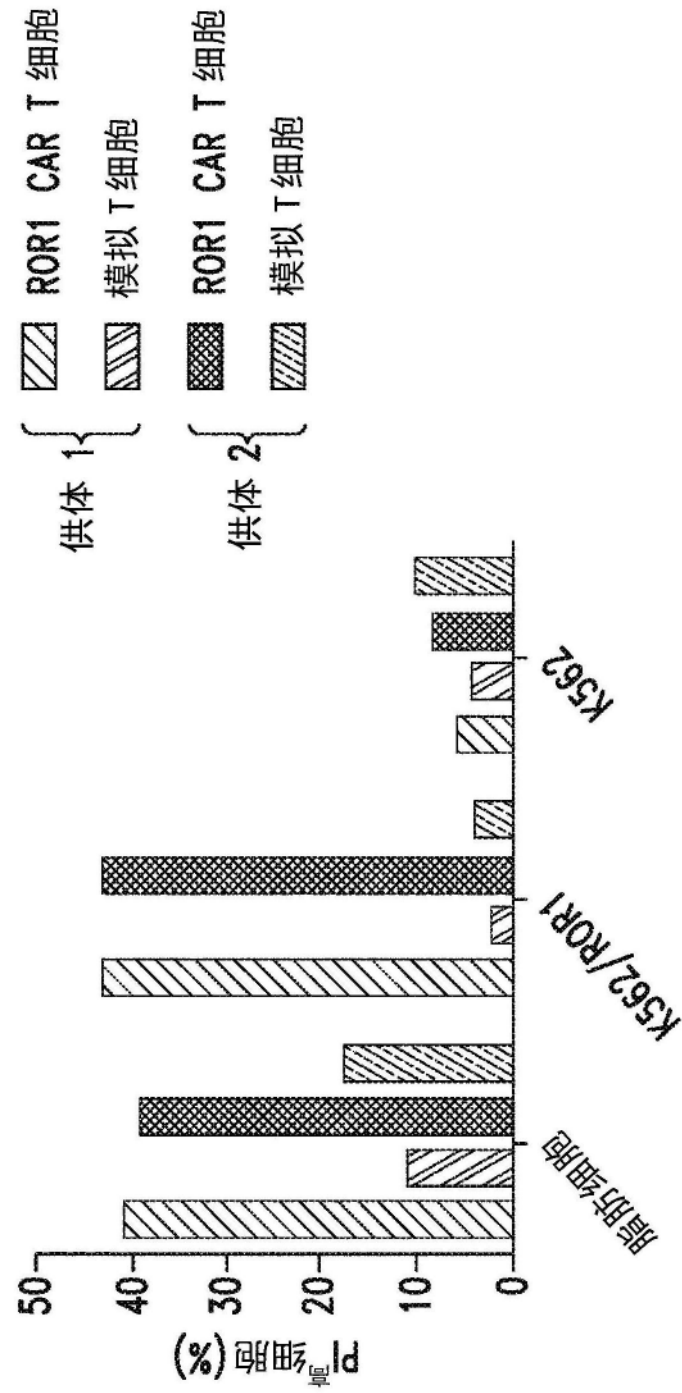


图22D

人	NPRYPNYMFPSQGITPQQIAGFIGPPIP	SEQ ID NO.:3
小鼠	...F.....A..	SEQ ID NO.:57
恒河猴I.....	SEQ ID NO.:59

图23A

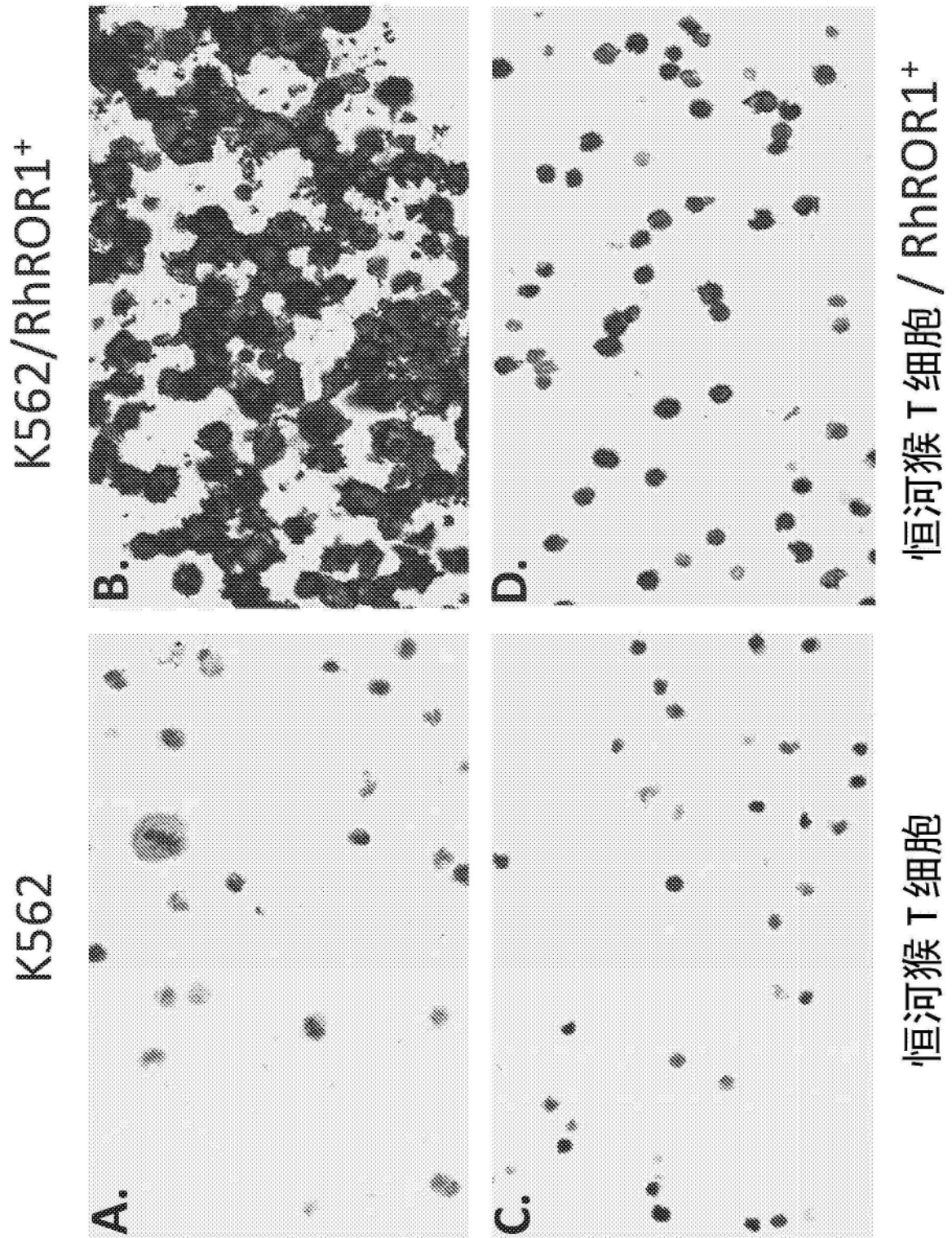


图23B

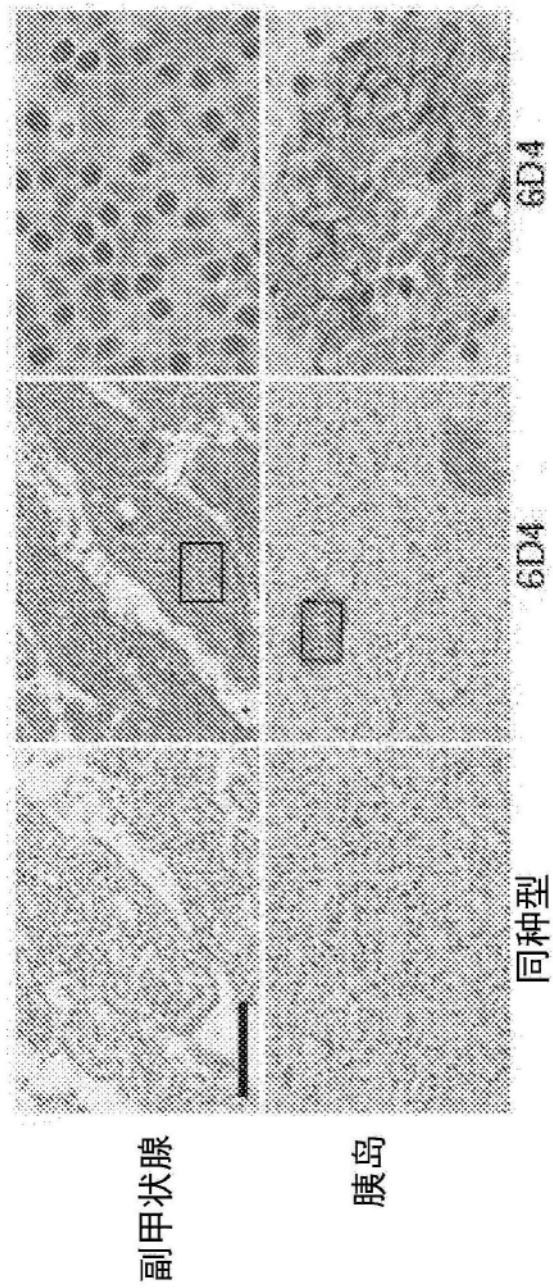


图23C

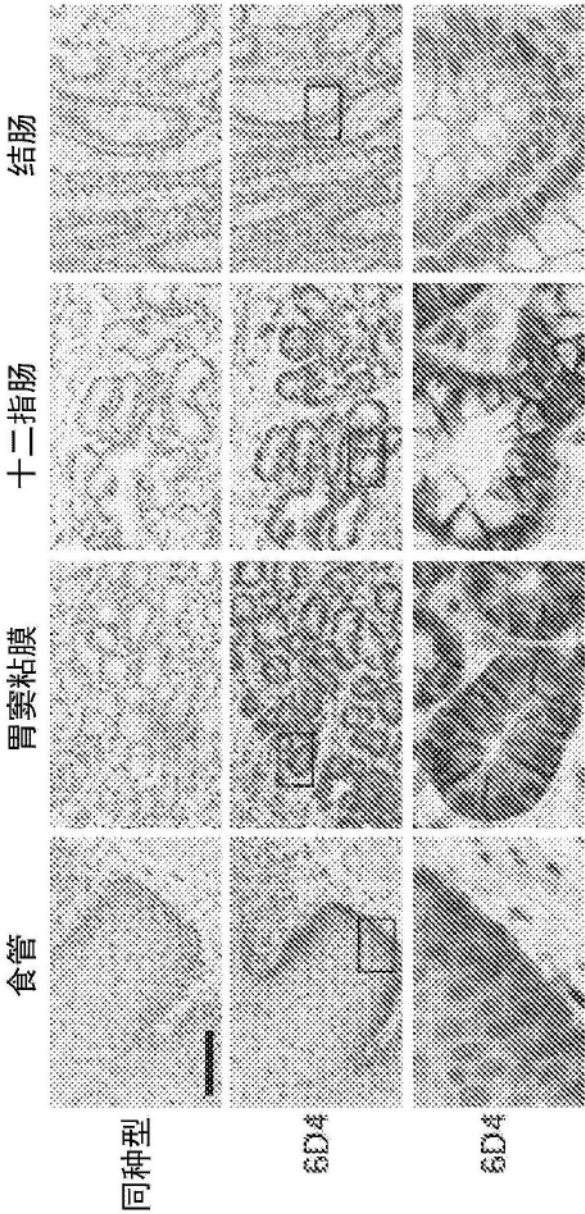


图23D