

MOLÉCULA DE UNIÓN DIRIGIDA A ROR1 Y USO DE LA MISMA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente solicitud se refiere a anticuerpos que reconocen específicamente ROR1, y a métodos de preparación y usos de los mismos. Además, la presente solicitud también se refiere a conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) dirigidos a ROR1 y composiciones que contienen la molécula. Además, la presente invención también se refiere a los usos terapéuticos y de diagnóstico de estos anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) son una clase de fármacos derivados de las terapias tradicionales con anticuerpos. Éstos consisten en anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos específicos conjugados con agentes citotóxicos de moléculas pequeñas mediante enlazadores. Esta combinación proporciona la especificidad de los anticuerpos y los efectos citotóxicos de las moléculas pequeñas tradicionales, lo que hace que los ADC sean especialmente adecuados para el tratamiento de tumores malignos. Debido a sus excelentes efectos antitumorales, los ADC se han convertido rápidamente en un punto central en el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Sin embargo, los ADC suelen tener una toxicidad más elevada, por lo que requieren una alta especificidad para los antígenos objetivo. Idealmente, los objetivos para el desarrollo de ADCs son antígenos altamente expresados en tumores pero poco o nada expresados en tejidos sanos. Los antígenos objetivo deben ser receptores de superficie regulados al alza en las células tumorales que promuevan el crecimiento o la supervivencia del tumor, y deben poseer propiedades de internalización.

Tanto el Receptor Huérfano Tipo Tirosina Quinasa 1 (ROR1, también conocido como Receptor Neurotrófico Tipo Tirosina Quinasa 1, NTRKR1) como el Receptor Huérfano Tipo Tirosina Quinasa 2 (ROR2) son proteínas transmembrana de paso único, pertenecientes a la familia de los receptores tirosina quinasa (RTK, por sus siglas en inglés). Su parte extracelular consta de un dominio similar a la inmunoglobulina (Ig) y dos dominios ricos en cisteína (dominio FZD y dominio KRD), y su parte intracelular consta de un dominio tirosina quinasa, dos dominios ricos en serina o treonina y un dominio rico en prolina. ROR1 y ROR2 participan en la vía de señalización Wnt no canónica uniéndose al ligando Wnt5a a través del dominio FZD (Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I,

Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC et al (2003). Genes Cells 8:645-654; Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro JE, Widhopf GF II, Rassenti LZ, Cantwell MJ, Prussak CE et al (2008). Proc Natl Acad Sci USA 105:3047-3052; Paganoni S, Bernstein J, Ferreira A (2010). Neuroscience 165:1261-1274). ROR1 puede inhibir la apoptosis, potenciar la señalización de EGFR e inducir la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro JE, Widhopf GF II, Rassenti LZ, Cantwell MJ, Prussak CE et al (2008). Proc Natl Acad Sci USA 105:3047-3052; Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, Hosono Y, Shimada Y, Arima C, Kato S, Tomida S, Suzuki M, Osada H et al (2012). Cancer Cell 21:348-361; Cui B, Zhang S, Chen L, Yu J, Widhopf GF, Fecteau J-F, Rassenti LZ, Kipps TJ (2013). Cancer Res 73:3649-3660).

ROR1 es una proteína embrionaria conservada, cuya expresión disminuye gradualmente con el desarrollo embrionario y está casi ausente o poco expresada en la mayoría de los tejidos adultos. Sin embargo, se ha descubierto en cada vez más literatura que ROR1 se expresa en diversas células cancerosas, como la leucemia linfocítica crónica de células B (CLL, por sus siglas en inglés) y otras neoplasias hematológicas, el cáncer de células renales, el cáncer de colon y algunas otras líneas celulares de cáncer de mama. Además, ROR1 desempeña un papel importante en la progresión de muchas neoplasias hematológicas y sólidas. Por lo tanto, como marcador del cáncer, ROR1 se convierte en un objetivo farmacológico ideal para el tratamiento del cáncer.

Aunque en el estado de la técnica se han descrito varios anticuerpos contra ROR1, sigue existiendo una necesidad urgente de desarrollar anticuerpos anti-ROR1 con alta calidad debida a ROR1 como marcadores tumorales para pan-cancerígenos. Dichos anticuerpos pueden usarse como base para desarrollar terapias dirigidas basadas en anticuerpos para cánceres que expresan ROR1, y también pueden usarse como herramienta de diagnóstico para detectar la expresión de ROR1 en enfermedades relacionadas con ROR1. Además, en vista de las buenas perspectivas mostradas por los ADCs en el campo del tratamiento de tumores, todavía existe una necesidad urgente de ADCs que contengan ROR1 con efectos terapéuticos eficaces, y la presente invención satisface estas necesidades.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo dirigido a ROR1, que tiene las siguientes ventajas:

- (1) unión a ROR1 y células objetivo que expresan ROR1 con alta afinidad;

- (2) capaz de penetrar en las células por internalización;
- (3) adecuados para construir conjugados anticuerpo-fármaco terapéuticos eficaces.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1 y un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

1) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 57 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 56;

2) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 55 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 54;

3) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 59 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 58;

4) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 61 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 60;

5) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 63 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 62;

6) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 65 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 64;

7) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 67 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 66;

8) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la

región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 68 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 66;

9) tres CDRs de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 70 y tres CDRs de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 69;

10) tres CDRs de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 72 y tres CDRs de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 71;

11) tres CDRs de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 74 y tres CDRs de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 73;

12) tres CDRs de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 75 y tres CDRs de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 79;

13) tres CDRs de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 76 y tres CDRs de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 81;

14) tres CDRs de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 77 y tres CDRs de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 82;

15) tres CDRs de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 78 y tres CDRs de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 80;

16) tres CDRs de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 78 y tres CDRs de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena

ligera como se muestra en SEQ ID NO: 81;

17) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 78 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 82; o bien

18) tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) comprendidas en la región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 84 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) comprendidas en la región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 89.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1 y un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

1) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 1, 2 y 3, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 28, 29 y 30, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

2) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 4, 5 y 6, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 31, 32 y 33, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

3) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 7, 8 y 9, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 34, 32 y 33, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

4) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en

SEQ ID NO: 10, 11 y 12, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 35, 32 y 36, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

5) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 4, 13 y 14, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 35, 32 y 37, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

6) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 15, 16 y 17, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 38, 32 y 33, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

7) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 18, 8 y 19, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 31, 32 y 33, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

8) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 20, 21 y 12, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 31, 32 y 33, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

9) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 22, 23 y 24, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 39, 40 y 41, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

10) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 4, 25 y 26, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 35, 32 y 33, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

11) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 18, 25 y 27, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 35, 32 y 33, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

12) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 4, 5 y 6, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 31, 45 y 48, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

13) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 4, 5 y 6, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 43, 46 y 48, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras),

deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

14) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 4, 5 y 6, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 44, 47 y 48, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

15) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 4, 42 y 6, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 31, 45 y 48, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

16) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 4, 42 y 6, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 43, 46 y 48, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias;

17) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 4, 42 y 6, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias como se muestra en SEQ ID NO: 44, 47 y 48, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; o

18) HCDR1, HCDR2, HCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 1, 2 y 3, o secuencias que contienen una o más y no más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias; y LCDR1, LCDR2, LCDR3 que comprenden las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 49, 50 y 30, o secuencias que contienen una o más y no

más de 3 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones relativas a dichas secuencias.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1 y un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada, en donde:

1) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 57, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, o consiste en SEQ ID NO: 57;

2) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 55, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, o consiste en SEQ ID NO: 55;

3) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 59, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, o consiste en SEQ ID NO: 59;

4) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 61, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, o consiste en SEQ ID NO: 61;

5) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 63, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, o consiste en SEQ ID NO: 63;

6) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 65, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, o consiste en SEQ ID NO: 65;

7) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 67, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, o consiste en SEQ ID NO: 67;

8) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos

mostrada en SEQ ID NO: 68, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, o consiste en SEQ ID NO: 68;

9) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, o consiste en SEQ ID NO: 70;

10) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72, o consiste en SEQ ID NO: 72;

11) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74, o consiste en SEQ ID NO: 74;

12) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 83, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, o consiste en SEQ ID NO: 83;

13) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 84, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, o consiste en SEQ ID NO: 84;

14) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, o consiste en SEQ ID NO: 85;

15) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 75, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75, o consiste en SEQ ID NO: 75;

16) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 76, o consiste en SEQ ID NO: 76;

17) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, o consiste en SEQ ID NO: 77; o

18) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 78, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, o consiste en SEQ ID NO: 78.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1 y un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera, en donde:

1) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 56, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, o consiste en SEQ ID NO: 56;

2) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 54, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, o consiste en SEQ ID NO: 54;

3) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 58, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, o consiste en SEQ ID NO: 58;

4) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, o consiste en SEQ ID NO: 60;

5) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, o consiste en SEQ ID NO: 62;

6) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 64, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, o consiste en SEQ ID NO: 64;

7) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 66, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o consiste en SEQ ID NO: 66;

8) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 69, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, o consiste en SEQ ID NO: 69;

9) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, o consiste en SEQ ID NO: 71;

10) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, o consiste en SEQ ID NO: 73;

11) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 79, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, o consiste en SEQ ID NO: 79;

12) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 80, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, o consiste en SEQ ID NO: 80;

13) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 81, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81, o consiste en SEQ ID NO: 81;

14) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 82, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, o consiste en SEQ ID NO: 82;

15) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 86, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, o consiste en SEQ ID NO: 86;

16) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 87, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87, o consiste en SEQ ID NO: 87;

17) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, o consiste en SEQ ID NO: 88; o

18) la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, o consiste en SEQ ID NO: 89.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1 y un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

1) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 57, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, o consiste en SEQ ID NO: 57, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 56, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, o consiste en SEQ ID NO: 56;

2) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 55, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, o consiste en SEQ ID NO: 55, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 54, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, o consiste en SEQ ID NO: 54;

3) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 59, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, o consiste en SEQ ID NO: 59, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 58, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, o consiste en SEQ ID NO: 58;

4) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 61, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, o consiste en SEQ ID NO: 61, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 60, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, o consiste en SEQ ID NO: 60;

5) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, o consiste en SEQ ID NO: 63, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 62, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, o consiste en SEQ ID NO: 62;

6) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 65, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, o consiste en SEQ ID NO: 65, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 64, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, o consiste en SEQ ID NO: 64;

7) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 67, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, o consiste en SEQ ID NO: 67, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 66, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o consiste en SEQ ID NO: 66;

8) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, o consiste en SEQ ID NO: 68, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 66, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o consiste en SEQ ID NO: 66;

9) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, o consiste en SEQ ID NO: 70, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 69, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, o consiste en SEQ ID NO: 69;

10) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72, o consiste en SEQ ID NO: 72, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 71, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, o consiste en SEQ ID NO: 71;

11) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74, o consiste en SEQ ID NO: 74, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, o consiste en SEQ ID NO: 73;

12) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75, o consiste en SEQ ID NO: 75, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 79, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, o consiste en SEQ ID NO: 79;

13) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, o consiste en SEQ ID NO: 76, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 80, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, o consiste en SEQ ID NO: 80;

14) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, o consiste en SEQ ID NO: 76, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 81, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81, o consiste en SEQ ID NO: 81;

15) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, o consiste en SEQ ID NO: 77, y la región variable de la

cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 80, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, o consiste en SEQ ID NO: 80;

16) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, o consiste en SEQ ID NO: 77, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 81, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81, o consiste en SEQ ID NO: 81;

17) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, o consiste en SEQ ID NO: 77, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 82, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, o consiste en SEQ ID NO: 82;

18) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, o consiste en SEQ ID NO: 78, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 80, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, o consiste en SEQ ID NO: 80;

19) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, o consiste en SEQ ID NO: 78, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 81, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81, o consiste en SEQ ID NO: 81;

20) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, o consiste en SEQ ID NO: 78, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 82, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, o consiste en SEQ ID NO: 82;

21) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 83, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, o consiste en SEQ ID NO: 83, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 86, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, o consiste en SEQ ID NO: 86;

22) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 83, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, o consiste en SEQ ID NO: 83, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 87, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87, o consiste en SEQ ID NO: 87;

23) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, o consiste en SEQ ID NO: 84, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 87, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87, o consiste en SEQ ID NO: 87;

24) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, o consiste en SEQ ID NO: 84, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 88, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, o consiste en SEQ ID NO: 88;

25) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, o consiste en SEQ ID NO: 84, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 89, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, o consiste en SEQ ID NO: 89;

26) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, o consiste en SEQ ID NO: 85, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 87, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87, o consiste en SEQ ID NO: 87;

27) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, o consiste en SEQ ID NO: 85, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, o consiste en SEQ ID NO: 88; o

28) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, o consiste en SEQ ID NO: 85, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 89, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, o consiste en SEQ ID NO: 89.

En algunas modalidades, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada y/o de cadena ligera derivada de la secuencia consenso de línea germinal de anticuerpos humanos. La región constante de cadena ligera es preferiblemente una región constante de cadena kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada puede ser de cadena γ , μ , α , δ o ϵ . En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada se deriva preferentemente de la secuencia de región constante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En una modalidad, la región constante de cadena ligera comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 53, o consiste en la secuencia. En otra modalidad, la región constante de la cadena pesada comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 52.

Se apreciará que también pueden usarse variantes de secuencia de estos dominios de región constante, por ejemplo, que comprendan una o más modificaciones de aminoácidos, en donde las posiciones de los aminoácidos se identifican según el Sistema de Índices de la UE de Kabat *et al* (1991).

En una modalidad específica, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ROR1 que se une específicamente a ROR1 y un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde:

1) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 93, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, o consiste en SEQ ID NO: 93, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 92, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92, o consiste en SEQ ID NO: 92;

2) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 91, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91, o consiste en SEQ ID NO: 91, y la cadena ligera comprende la secuencia de

aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, o consiste en SEQ ID NO: 90;

3) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 95, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, o consiste en SEQ ID NO: 95, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 94, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94, o consiste en SEQ ID NO: 94;

4) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 97, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, o consiste en SEQ ID NO: 97, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 96, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96, o consiste en SEQ ID NO: 96;

5) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 99, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, o consiste en SEQ ID NO: 99, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, o consiste en SEQ ID NO: 98;

6) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 101, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101, o consiste en SEQ ID NO: 101, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 100, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100, o consiste en SEQ ID NO: 100;

7) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 103, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

103, o consiste en SEQ ID NO: 103, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 102, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102, o consiste en SEQ ID NO: 102;

8) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 104, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104, o consiste en SEQ ID NO: 104, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 102, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102, o consiste en SEQ ID NO: 102;

9) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 106, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106, o consiste en SEQ ID NO: 106, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 105, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, o consiste en SEQ ID NO: 105;

10) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 108, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108, o consiste en SEQ ID NO: 108, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 107, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107, o consiste en SEQ ID NO: 107;

11) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 110, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110, o consiste en SEQ ID NO: 110, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 109, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109, o consiste en SEQ ID NO: 109;

12) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 111, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111, o consiste en SEQ ID NO: 111, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 115, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115, o consiste en SEQ ID NO: 115;

13) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 112, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112, o consiste en SEQ ID NO: 112, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 116, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116, o consiste en SEQ ID NO: 116;

14) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 112, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112, o consiste en SEQ ID NO: 112, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 117, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117, o consiste en SEQ ID NO: 117;

15) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 113, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113, o consiste en SEQ ID NO: 113, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 116, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116, o consiste en SEQ ID NO: 116;

16) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 113, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113, o consiste en SEQ ID NO: 113, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 117, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117, o consiste en SEQ ID NO: 117;

17) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ

ID NO: 113, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113, o consiste en SEQ ID NO: 113, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 118, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, o consiste en SEQ ID NO: 118;

18) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 114, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114, o consiste en SEQ ID NO: 114, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 116, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116, o consiste en SEQ ID NO: 116;

19) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 114, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114, o consiste en SEQ ID NO: 114, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 117, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117, o consiste en SEQ ID NO: 117;

20) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 114, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114, o consiste en SEQ ID NO: 114, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 118, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, o consiste en SEQ ID NO: 118;

21) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 119, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119, o consiste en SEQ ID NO: 119, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 122, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, o consiste en SEQ ID NO: 122;

22) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 119, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119, o consiste en SEQ ID NO: 119, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 123, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123, o consiste en SEQ ID NO: 123;

23) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 120, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120, o consiste en SEQ ID NO: 120, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 123, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123, o consiste en SEQ ID NO: 123;

24) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 120, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120, o consiste en SEQ ID NO: 120, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 124, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, o consiste en SEQ ID NO: 124;

25) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 120, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120, o consiste en SEQ ID NO: 120, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 125, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125, o consiste en SEQ ID NO: 125;

26) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 121, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, o consiste en SEQ ID NO: 121, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 123, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123, o consiste en SEQ ID NO: 123;

27) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 121, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, o consiste en SEQ ID NO: 121, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 124, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, o consiste en SEQ ID NO: 124; o

28) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 121, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, o consiste en SEQ ID NO: 121, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 125, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125, o consiste en SEQ ID NO: 125.

En ciertas modalidades de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, el anticuerpo es monoclonal.

En ciertas modalidades de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

En una modalidad, el anticuerpo anti-ROR1 de la invención es un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En otra modalidad, el anticuerpo anti-ROR1 de la invención abarca sólo la porción de unión a antígeno del mismo, tal como: Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o fragmento (Fab')₂.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a ROR1 humano, teniendo el conjugado anticuerpo-fármaco las siguientes ventajas:

(1) unión a células objetivo que expresan ROR1 con alta afinidad;

(2) capaces de entrar en las células mediante internalización y matar las células objetivo; en algunas modalidades, los ADC de la presente invención tienen una alta tasa de internalización;

(3) tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada con una función o expresión anormal de ROR1 (por *ejemplo*, cáncer, como neoplasia hematológica, tumor sólido) en un sujeto, o tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad;

(4) reducir o inhibir el crecimiento o la progresión tumoral en un sujeto que tenga un

tumor que exprese ROR1;

(5) inducir la regresión de los tumores que expresan ROR1 (por *ejemplo*, regresión a largo plazo);

(6) ejerciendo actividad citotóxica en células que expresan ROR1.

En una modalidad, la presente solicitud proporciona un conjugado que comprende el anticuerpo anti-ROR1 del primer aspecto. En una modalidad específica, las moléculas que pueden conjugarse con el anticuerpo anti-ROR1 son, por ejemplo, agentes citotóxicos, inmunomoduladores, agentes de formación de imágenes, proteínas fluorescentes, marcadores moleculares, proteínas terapéuticas, biopolímeros y oligonucleótidos, etc.

En una modalidad, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés), que comprende el anticuerpo anti-ROR1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto y al menos una sustancia terapéuticamente activa o ingrediente farmacéuticamente activo, que tiene la estructura de $Ab-(L-D)_n$, en donde: Ab es el anticuerpo de unión a ROR1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según se describe en el primer aspecto de la presente invención; L es un enlazador; D es una sustancia terapéuticamente activa o un ingrediente farmacéuticamente activo, y n representa un número entero de 1 a 20, tal como 1, 2, 3, 4, 5, etc..

En una modalidad, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende una pluralidad de componentes D, que pueden ser una combinación de diferentes sustancias terapéuticamente activas o ingredientes farmacéuticamente activos, o una combinación de las mismas sustancias terapéuticamente activas o ingredientes farmacéuticamente activos. En una modalidad, el conjugado anticuerpo-fármaco tiene una relación fármaco/anticuerpo (DAR) de 1 a 20, como por ejemplo un valor DAR de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En una modalidad, el DAR es un DAR medio. En una modalidad, el DAR medio oscila entre 1 y 15, *por ejemplo*, entre 1 y 10, entre 2 y 8, entre 2 y 6 o entre 3 y 5. En una modalidad específica, el DAR medio es 3,7.

En una modalidad específica, la sustancia terapéuticamente activa o el ingrediente farmacéuticamente activo es una citotoxina, una toxina vegetal, una toxina de molécula pequeña, un isótopo radiactivo, alcaloides de maytansina o similares. En una modalidad específica, la citotoxina es dolastatina y derivados de auristatina de la misma, tales como 0101(2-metilpropionil -N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxi-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)-etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxiheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 8261 (2- metilpropionil -N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-

carboxil-2-fenetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxipropil]pirrolidina-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxiheptano-4-il]-N-metil-L-valinamida), Dolastatina 10, Dolastatina 15, auristatina E, auristatina PE, monometil auristatina D (MMAD, por sus siglas en inglés), monometil auristatina E (MMAE, por sus siglas en inglés), monometil auristatina F (MMAF, por sus siglas en inglés), auristatina F fenilendiamina (AFP, por sus siglas en inglés), auristatina EB (AEB, por sus siglas en inglés), auristatina EFP (AEFP, por sus siglas en inglés), auristatina F hidroxipropilamida (AFHPA, por sus siglas en inglés). En otra modalidad, los derivados de dolastatina y auristatina son auristatina, dolastatina, MMAE, MMAF, auristatina F hidroxipropilamida o auristatina F fenilendiamina.

En una modalidad, la citotoxina está unida covalentemente al anticuerpo anti-ROR1 o al fragmento de unión a antígeno del mismo de manera no específica de sitio o específica de sitio mediante un enlazador.

En una modalidad, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en maleimido-hexanoil-valina-citrulina-p-aminobenzoiloxi (mc-vc-PAB), acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (AcLys-VC-PABC), amino PEG6-propionilo, maleimidocaproilo (mc), maleimidopropionilo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxicarbonilo (PAB), N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butirato (SPDB), N-succinimidil 3-(piridin-2-yliditio)-propionato (SPDP).

En una modalidad, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende el anticuerpo anti-ROR1 o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el primer aspecto y el inhibidor de tubulina (MMAE, por sus siglas en inglés). En otra modalidad, MMAE se conjuga con el grupo tiol de la cisteína en el anticuerpo anti-ROR1 a través de un enlazador MC-VC-PAB, que tiene la estructura de anticuerpo anti-ROR1-MC-VC-PAB-MMAE. Los anticuerpos IgG1 tienen 16 pares de residuos de cisteína, que están presentes en forma de 12 enlaces disulfuro intracadena y 4 entre cadenas. Los enlaces disulfuro entre cadenas son disolventes accesibles y pueden reducirse mediante agentes reductores para formar ocho grupos sulfhidrilo, que se convierten en objetivos de conjugación (McCombs J, Owen S. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. AAPS J. 2015;17:339-51).

En una modalidad específica, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende o consiste en el anticuerpo monoclonal anti-ROR1 B62-H3L3 y MC-VC-PAB-MMAE. En otra modalidad, MMAE se conjuga con el grupo tiol de la cisteína en B62-H3L3 mediante un

enlazador MC-VC-PAB.

En otra modalidad específica, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende o consiste en el anticuerpo monoclonal anti-ROR1 B31-H3L3 y MC-VC-PAB-MMAE. En otra modalidad, MMAE se conjuga con el grupo tiol de la cisteína en B31-H3L3 mediante un enlazador MC-VC-PAB.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (1) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto o el conjugado anticuerpo-fármaco del segundo aspecto, y (2) un portador farmacéuticamente aceptable.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una molécula polinucleotídica aislada que codifica cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el primer aspecto.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico del cuarto aspecto. En una modalidad, el vector es un vector de expresión.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el vector del quinto aspecto o la molécula de ácido nucleico de la cuarta invención. En algunas modalidades, la célula huésped es procariota, tal como *E. coli*. En otras modalidades, la célula huésped es eucariota, como la célula HEK293, la célula CHO, la célula de levadura o la célula vegetal.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad asociada con la expresión anormal de ROR1 en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad preventiva o terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, o una cantidad preventiva o terapéuticamente eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, o una cantidad preventiva o terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención.

En una modalidad, la enfermedad asociada con la expresión anormal de ROR1 es un cáncer que expresa altamente ROR1, como la leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), la leucemia linfocítica aguda (LLA, por sus siglas en inglés), el linfoma de células del manto, el carcinoma de células renales, el cáncer de colon, el cáncer gástrico, el cáncer de mama, el neuroblastoma, el cáncer de pulmón, el cáncer de cabeza y cuello y el melanoma. En una modalidad específica, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas. En una modalidad específica, el cáncer de mama es un cáncer de

mama triple negativo.

En algunas modalidades, las moléculas ADC o composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse en combinación con una o más terapias, como modalidades de tratamiento y/u otros agentes terapéuticos, para los usos descritos en el presente documento, como para prevenir y/o tratar las enfermedades o afecciones pertinentes mencionadas en el presente documento.

En una modalidad específica, la presente invención proporciona un método para destruir células que expresan ROR1 o inhibir el crecimiento de células que expresan ROR1, que comprende poner en contacto las células con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, o una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, o una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-ROR1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en la preparación de un conjugado anticuerpo-fármaco para prevenir o tratar el cáncer.

La presente invención también proporciona el uso de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-ROR1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en la preparación de un fármaco para prevenir o tratar el cáncer.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la actividad de unión de cada clon de anticuerpo murino Fab obtenido en la presente solicitud que se une a células huROR1-HEK293 determinada por FACS; la **Figura 1A** muestra la actividad de unión del lisado de clon B31 Fab, B32 Fab, B34 Fab, B39 Fab, B62 Fab, B74 Fab, C38 Fab, M71 Fab y M78 Fab que se une a células huROR1-HEK293 ; La **Figura 1B** muestra la actividad de unión de los lisados C42 Fab y C77 Fab a las células huROR1-HEK293; NC representa el control negativo, y MFI representa la mediana de la intensidad de fluorescencia.

Las **Figuras 2A-2L** muestran los resultados SEC-HPLC de los anticuerpos de la presente solicitud; la **Figura 2A** muestra los resultados SEC-HPLC de B31; la **Figura 2B** muestra los resultados SEC-HPLC de B32; la **Figura 2C** muestra los resultados SEC-HPLC de B34; la **Figura 2D** muestra los resultados SEC-HPLC de B39; la **Figura 2E** muestra los resultados SEC-HPLC de B62; la **Figura 2F** muestra los resultados SEC-HPLC de B74; la **Figura 2G** muestra los resultados SEC-HPLC de C38; la **Figura 2H** muestra los resultados SEC-HPLC de M71; la **Figura 2I** muestra los resultados SEC-HPLC de M78; la **Figura 2J**

muestra los resultados SEC-HPLC de C42; la **Figura 2K** muestra los resultados SEC-HPLC de C77; la **Figura 2L** muestra los resultados SEC-HPLC de 99961.1.

Las **Figuras 3A-3B** muestran la actividad de unión de los anticuerpos de la presente solicitud a la proteína antígeno huROR1-His determinada por ELISA; la **Figura 3A** muestra la actividad de unión de B31, B32, B34, B39, B62 y B74 a la proteína antígeno huROR1-His; la **Figura 3B** muestra la actividad de unión de C38, C42, C77, M71 y M78 a la proteína antígeno huROR1-His.

Las **Figuras 4A-4B** muestran la actividad de unión de los anticuerpos de la presente solicitud a células tumorales A549 determinada por FACS; la **Figura 4A** muestra la actividad de unión de B31, B32, B34, B39, B62 y B74 a células tumorales A549; la **Figura 4B** muestra la actividad de unión de C38, C42, C77, M71 y M78 a células tumorales A549.

Las **Figuras 5A-5B** muestran la actividad de los anticuerpos de la presente solicitud que se unen a células huROR1-HEK293 determinada por FACS; la **Figura 5A** muestra la actividad de B31, B32, B34, B39, B62 y B74 que se unen a células huROR1-HEK293; la **Figura 5B** muestra la actividad de C38, C42, C77, M71 y M78 que se unen a células huROR1-HEK293.

Las **Figuras 6A-6B** muestran la actividad de los anticuerpos de la presente solicitud que se unen a la proteína antígeno MusROR1-His determinada por ELISA; la **Figura 6A** muestra la actividad de B31, B32, B34, B39 y B62 que se unen a la proteína antígeno MusROR1-His; la **Figura 6B** muestra la actividad de B74, C38, C42, C77, M71 y M78 que se unen a la proteína antígeno MusROR1-His.

Las **Figuras 7A-7B** muestran la actividad de los anticuerpos de la presente solicitud que se unen a la proteína antígeno huROR2-His determinada por ELISA; la **Figura 7A** muestra la actividad de B31, B32, B34, B39 y B62 que se unen a la proteína antígeno huROR2-His; la **Figura 7B** muestra la actividad de B74, C38, C42, C77, M71 y M78 que se unen a la proteína antígeno huROR2-His.

Las **Figuras 8A-8B** muestran la tasa de internalización de los anticuerpos de la presente solicitud en células huROR1-HEK293 determinada por FACS; la **Figura 8A** muestra la tasa de internalización de B62 y C42 en células huROR1-HEK293; la **Figura 8B** muestra la tasa de internalización de B31, B32, B34, B39, B74, C38, C77, M71 y M78 en células huROR1-HEK293.

Las **Figuras 9A-9F** muestran la tasa de internalización de los anticuerpos de la presente solicitud en células huROR1-HEK293 determinada por el método Fab-Zap; la **Figura 9A** muestra la tasa de internalización de B31 y B32 en células huROR1-HEK293; la

Figura 9B muestra la tasa de internalización de B34 y B39 en células huROR1-HEK293; La **Figura 9C** muestra la tasa de internalización de B74 y C38 en células huROR1-HEK293; la **Figura 9D** muestra la tasa de internalización de C77 y M71 en células huROR1-HEK293; la **Figura 9E** muestra la tasa de internalización de M78 en células huROR1-HEK293; la **Figura 9F** muestra la tasa de internalización de B62 y C42 en células huROR1-HEK293.

Las **Figuras 10A-10E** muestran la actividad de los anticuerpos humanizados que se unen a la proteína antígeno huROR1-His determinada por ELISA ; La **Figura 10A** muestra la actividad de B31-H2L2, B31-H1L1 y B31-H2L3 que se unen a la proteína antígeno huROR1-His; la **Figura 10B** muestra la actividad de B31-H3L2, B31-H3L3 y B31-H3L4 que se unen a la proteína antígeno huROR1-His; La **Figura 10C** muestra la actividad de unión de B31-H4L2, B31-H4L3 y B31-H4L4 a la proteína antígeno huROR1-His; La **Figura 10D** muestra la actividad de unión de B62-H1L1, B62-H1L2, B62-H2L2 y B62-H2L3 a la proteína antígeno huROR1-His; La **Figura 10E** muestra la actividad de unión de B62-H2L4, B62-H3L2, B62-H3L3 y B62-H3L4 a la proteína antígeno huROR1-His.

Las **Figuras 11A-11B** muestran la actividad de los anticuerpos humanizados que se unen a células tumorales A549 determinada por FACS; la **Figura 11A** muestra la actividad de B31-H1L1, B31-H2L2, B31-H2L3, B31-H3L2, B31-H3L3, B31-H3L4, B31-H4L2, B31-H4L3 y B31-H4L4 que se unen a células tumorales A549; La **Figura 11B** muestra la actividad de unión de B62-H1L1, B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H2L4, B62-H3L2, B62-H3L3 y B62-H3L4 a células tumorales A549.

La **Figura 12** muestra la tasa de internalización de B31-H3L3 y B62-H3L3 en células huROR1-HEK293 determinada por el método Fab-Zap.

Las **Figuras 13A-13B** muestran la actividad de los ADC de la presente solicitud que se unen a células tumorales A549 y HT29 determinada por FACS; la **Figura 13A** muestra la actividad de B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE que se unen a células tumorales A549; la **Figura 13B** muestra la actividad de B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE que se unen a células tumorales HT29.

Las **Figuras 14A-14D** muestran la tasa de destrucción de células tumorales de los ADC de la presente solicitud detectada mediante el método MTS; la **Figura 14A** muestra el efecto de B31-H3L3-MMAE en la destrucción de células tumorales A549; la **Figura 14B** muestra el efecto de B62-H3L3-MMAE en la destrucción de células tumorales A549; la **Figura 14C** muestra el efecto de B31-H3L3-MMAE en la destrucción de células tumorales HT29; la **Figura 14D** muestra el efecto de B62-H3L3-MMAE en la destrucción de células tumorales HT29.

Las **Figuras 15A-15C** muestran el efecto de los ADC de la presente solicitud sobre la destrucción de tres células tumorales, Jeko-1, MDA-MB-468 y NCI-H1944, determinado por el método CCK8; la **Figura 15A** muestra el efecto de B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE sobre la destrucción de células Jeko-1; La **Figura 15B** muestra el efecto de B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE en la destrucción de células Jeko-1; la **Figura 15C** muestra el efecto de B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE en la destrucción de células NCI-H1944.

La **Figura 16** muestra el efecto letal dependiente de antígeno de los ADC de la presente solicitud sobre células huROR1-HEK293 medido por el método CCK8.

Las **Figuras 17A-17B** muestran la tasa de internalización de los ADC de la presente solicitud en células tumorales A549 y HT-29 determinada por FACS; la **Figura 17A** muestra la tasa de internalización de B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE en células tumorales A549; la **Figura 17B** muestra la tasa de internalización de B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE en células tumorales HT-29.

Las **Figuras 18A-18C** muestran el efecto supresor tumoral *in vivo* de los ADC de la presente solicitud en modelos de ratón con tumor HT-29; la **Figura 18A** muestra los cambios en el volumen tumoral en ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental, con flechas que indican los puntos temporales de administración del fármaco; la **Figura 18B** muestra los cambios en el peso corporal de ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental; la **Figura 18C** muestra el peso tumoral en ratones de diferentes grupos experimentales tras finalizar el experimento.

Las **Figuras 19A-19C** muestran el efecto supresor tumoral *in vivo* de los ADC de la presente solicitud en modelos de ratón con tumor A549; la **Figura 19A** muestra los cambios en el volumen tumoral en ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental; la **Figura 19B** muestra los cambios en el peso corporal de ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental; la **Figura 19C** muestra el peso tumoral en ratones de diferentes grupos experimentales tras finalizar el experimento.

Las **Figuras 20A-20B** muestran el efecto supresor tumoral *in vivo* de los ADC de la presente solicitud en modelos de ratón con tumor NCI-N87; la **Figura 20A** muestra los cambios en el volumen tumoral en ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental, con flechas que indican los puntos temporales de administración del fármaco; la **Figura 20B** muestra los cambios en el peso corporal de ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental.

Las **Figuras 21A-21B** muestran el efecto supresor tumoral *in vivo* de los ADC de la presente solicitud en modelos de ratón con tumor MDA-MB-231; la **Figura 21A** muestra los cambios en el volumen tumoral en ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental, con flechas que indican los puntos temporales de administración del fármaco; la **Figura 21B** muestra los cambios en el peso corporal de ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental.

Las **Figuras 22A-22B** muestran el efecto supresor tumoral *in vivo* de los ADC de la presente solicitud en modelos de ratón con tumor MDA-MB-468; la **Figura 22A** muestra los cambios en el volumen tumoral en ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental, con flechas que indican los puntos temporales de administración del fármaco; la **Figura 22B** muestra los cambios en el peso corporal de ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental.

Las **Figuras 23A-23B** muestran el efecto supresor tumoral *in vivo* de los ADC de la presente solicitud en modelos de ratón con tumor Jeko-1; la **Figura 23A** muestra los cambios en el volumen tumoral en ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental, con flechas que indican los puntos temporales de administración del fármaco; la **Figura 23B** muestra los cambios en el peso corporal de ratones de diferentes grupos experimentales durante el periodo experimental.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares aquí descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. Además, la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente modalidades particulares y no pretende ser limitativa.

I. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia. A efectos de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

El término "aproximadamente", cuando se usa en relación con un valor numérico, se refiere a valores numéricos comprendidos entre el límite inferior del 10% menos que el valor numérico especificado y el límite superior del 10% más que el valor numérico especificado.

El término "y/o", cuando se usa junto con dos o más alternativas, debe entenderse como cualquiera de las alternativas o dos o más de las alternativas.

En el presente documento, los términos "que comprende", "que comprende", "que incluye" o "que incluye" significan incluir los elementos, números enteros o pasos indicados, pero no excluyen ningún otro elemento, número entero o paso. Cuando el término "que comprende" o "incluyendo" se usa en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, también abarca la situación consistente en los elementos, números enteros o pasos indicados. Por ejemplo, cuando se hace referencia a una región variable de anticuerpo que "comprende" una secuencia específica, también se pretende abarcar una región variable de anticuerpo que consiste en la secuencia específica.

El término "ROR1" se refiere a cualquier forma recombinante o natural del Receptor Huérfano 1 similar a la Tirosina Quinasa Receptora (ROR1), variante u homólogo del mismo, que mantiene, por ejemplo, al menos el 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la actividad del ROR1. La variante u homólogo tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína ROR1 natural en toda la secuencia o en una secuencia parcial (*por ejemplo*, 50, 100, 150 o 200 aminoácidos consecutivos). En una modalidad, la proteína ROR1 incluye la secuencia de aminoácidos de Uniprot ID: Q01973.

ROR1 se expresa en gran medida en el embrión, y luego su nivel de expresión disminuye significativamente en la etapa adulta. Sin embargo, se ha descubierto que la expresión de ROR1 aumenta significativamente en varias neoplasias hematológicas y tumores sólidos. Entre las neoplasias hematológicas que expresan altamente ROR1 se encuentran la leucemia linfocítica crónica de células B (CLL, por sus siglas en inglés), la leucemia linfocítica aguda (LLA, por sus siglas en inglés), el linfoma no hodgkiniano (LNH, por sus siglas en inglés) y la neoplasia hematológica mieloide. Entre los tumores sólidos, los cánceres que expresan ROR1 incluyen el cáncer de colon, el cáncer de mama, el cáncer intestinal, el cáncer de pulmón, el cáncer de páncreas, el cáncer de ovario, etc.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio del presente documento y abarca una variedad de estructuras de anticuerpos, incluyendo pero no limitándose a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada. Un anticuerpo intacto generalmente contiene al menos dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, pero puede incluir menos cadenas en algunos casos, por ejemplo, los

anticuerpos que se producen naturalmente en los camellos pueden contener sólo cadenas pesadas.

El término "anticuerpo anti-ROR1" se refiere a una molécula de anticuerpo que se une específicamente a ROR1 y es capaz de inhibir la actividad de ROR1. Un anticuerpo anti-ROR1 puede inhibir la actividad de ROR1 en relación con la ausencia del anticuerpo ROR1, por ejemplo, bloqueando al menos parcial o completamente la estimulación de ROR1, reduciendo, impidiendo o retrasando la activación de ROR1, o inactivando, desensibilizando o regulando a la baja la señalización, actividad o cantidad de ROR1. En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de ROR1 en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con un control.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto, dicha molécula comprende una porción del anticuerpo intacto y se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ ; diabodies; anticuerpos lineales; anticuerpos de cadena simple (por ejemplo, scFv); anticuerpos de dominio simple; anticuerpos bivalentes o biespecíficos o fragmentos de los mismos; anticuerpos camélidos (anticuerpos de cadena pesada); y anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos) compuestos de fragmentos de anticuerpos.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que interviene en la unión del anticuerpo a un antígeno. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos naturales suelen tener estructuras similares, en donde cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) conservadas y tres regiones determinantes de la complementariedad (véase, *por ejemplo*, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6ª ed., WH Freeman and Co. página 91 (2007)). Un solo dominio VH o VL es suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno.

El término "regiones determinantes de la complementariedad" o "regiones CDR" o "CDRs" son las regiones en los dominios variables de los anticuerpos, que son altamente variables en secuencia y forman bucles estructuralmente definidos ("bucle hipervariable"), y/o incluyen residuos de contacto con el antígeno ("puntos de contacto con el antígeno"). Los CDR son los principales responsables de la unión a los epítopos antigénicos. Los CDR del dominio variable se designan comúnmente como CDR1, CDR2 y CDR3, numerados secuencialmente a partir del N-terminal. Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de cada CDR en una región variable dada pueden determinarse usando uno

cualquiera o una combinación de varios esquemas de asignación de CDR establecidos, incluyendo, por ejemplo, el de Chothia basado en la estructura tridimensional del anticuerpo y la topología de los bucles CDR (Chothia *et al.* (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani *et al.*, "Conformaciones estándar para las estructuras canónicas de las inmunoglobulinas", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948(1997)), Kabat basándose en la variabilidad de las secuencias de anticuerpos (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), International ImMunoGeneTics database (IMGT) (<http://imgt.cines.fr/>), y definición de CDR del Norte basada en la agrupación por propagación de afinidades mediante el uso de un gran número de estructuras cristalinas.

A menos que se indique lo contrario, en la presente invención, los términos "CDR" o "secuencias CDR" abarcan las secuencias CDR determinadas de cualquiera de las formas descritas anteriormente.

Las CDR también pueden determinarse basándose en una secuencia CDR de referencia (por ejemplo, cualquiera de las CDR ejemplares de la presente invención) que tenga la misma posición de numeración AbM. En una modalidad, las CDR del anticuerpo de la invención se posicionan según el esquema de numeración AbM.

A menos que se indique lo contrario, en la presente invención, al referirnos a posiciones de residuos en regiones variables de anticuerpos y CDR (incluidos los residuos de la región variable de cadena pesada), nos referimos a aquellas según el sistema de numeración AbM.

Anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de CDR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En algunas modalidades, todas o sustancialmente todas las CDR (*por ejemplo*, las CDR) de un anticuerpo humanizado corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede contener opcionalmente al menos una porción de región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. La "forma humanizada" de un anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo no humano) se refiere a un anticuerpo que ha sido humanizado.

En el presente documento, los términos "unión" o "unión específica" significan que la unión es selectiva para un antígeno y puede distinguirse de interacciones no deseadas o inespecíficas. La capacidad de un sitio de unión a antígeno para unirse a un antígeno específico puede determinarse mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA, por sus

siglas en inglés) o ensayos de unión convencionales conocidos en la técnica, como el radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) o la interferometría de capa fina de biopelícula o el ensayo MSD o la resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés).

El término "media concentración efectiva (CE_{50})" se refiere a la concentración de un fármaco, anticuerpo o agente tóxico que induce una respuesta que es el 50% entre el valor basal y el máximo después de un tiempo de exposición especificado.

El término "agente terapéutico", tal como se usa en el presente documento, engloba cualquier sustancia eficaz para prevenir o tratar tumores, como el cáncer, incluidos agentes quimioterapéuticos, citocinas, inhibidores de la angiogénesis, agentes citotóxicos, otros anticuerpos, fármacos de moléculas pequeñas o inmunomoduladores (*por ejemplo*, inmunosupresores).

El término "conjugado anticuerpo-fármaco" o "ADC" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo acoplado covalentemente a una sustancia terapéuticamente activa o ingrediente farmacéutico activo, de tal manera que la sustancia terapéuticamente activa o ingrediente farmacéutico activo se dirige al objetivo de unión del anticuerpo para mostrar su función farmacológica. La sustancia terapéuticamente activa o el ingrediente farmacéutico activo puede ser una citotoxina capaz de destruir células, preferiblemente células cancerosas, a las que se dirige el ADC. La unión covalente de las sustancias terapéuticamente activas, los ingredientes farmacéuticos activos o las citotoxinas puede realizarse de manera no específica de sitio usando enlazadores, o de manera específica de sitio.

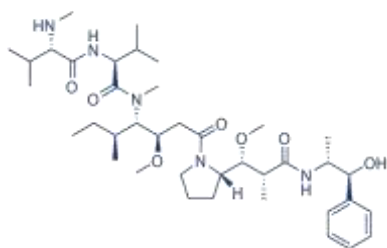
El término "conjugación de sitio específico" se refiere a un método para vincular específicamente una sustancia terapéuticamente activa o un ingrediente farmacéutico activo a un sitio específico de un anticuerpo. En una modalidad, la conjugación se realiza mediante un enlazador.

Los términos "agente citotóxico" y "citotoxina" se usan indistintamente y se refieren a una sustancia que inhibe o altera la función celular y/o causa la muerte o destrucción celular en la presente invención. En una modalidad, el agente citotóxico puede incluir, entre otras, toxinas bacterianas (*p. ej.*, toxina diftérica), toxinas vegetales (*p. ej.*, ricina), toxinas de moléculas pequeñas, isótopos radiactivos, alcaloides de maytansina y similares, específicamente, como antraciclina, camptotecina, combretastatina, dolastatina y sus derivados auristatina, duocarmicina, enedina, geldanamicina, dímero de indolino-benzodiazepina, maytansina, puromicina, dímero de pirrolobenzodiazepina, taxano,

alcaloide de vinca, tubulisina, hemiasterlina, espliceostatina, pladienolida y calicheamicina.

Cualquier conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención puede prepararse conjugando el anticuerpo con dolastatina y sus derivados de auristatina. La dolastatina y sus derivados de auristatina son citotoxinas importantes utilizadas en conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). Interfieren en la dinámica de los microtúbulos, la división celular, etc., y tienen actividades antitumorales y antifúngicas. La modificación de su esqueleto ha sido ampliamente reportada en las literaturas, principalmente la modificación de las subunidades terminales: modificación de P1 (N-terminal) y P5 (C-terminal). La modificación de la subunidad peptídica central también da lugar a una citotoxicidad in vitro eficaz de este tipo de sustancias. En un aspecto, la dolastatina y sus derivados auristatina pueden ser, por ejemplo, 0101(2-metilpropionil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxi-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)-etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxiheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 8261 (2-metilpropionil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxil-2-fenetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxiheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), Dolastatina 10, Dolastatina 15, auristatina E, auristatina PE, monometil auristatina D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), auristatina F fenilendiamina (AFP), auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), auristatina F hidroxipropilamida (AF AFHPA), y otras auristatinas, por ejemplo, auristatinas descritas en la publicación estadounidense No. 20130129753.

La monometil auristatina (MMAE), también conocida como demetil-auristatina E, es un conocido miembro de la familia de compuestos de la auristatina. Su fórmula estructural es la siguiente:



La MMAE desempeña un papel inhibidor eficaz en la mitosis al inhibir la polimerización de la tubulina. No puede usarse como fármaco debido a su citotoxicidad, pero se ha utilizado ampliamente para preparar conjugados de anticuerpos. El MMAE se conjugó con un anticuerpo monoclonal (MAB, por sus siglas en inglés) mediante un enlazador para formar el MMAE-MAB. Generalmente, MMAE-MAB se dirige a las células tumorales a través de anticuerpos, y el enlazador se escinde después de que MMAE-MAB

penetre en las células tumorales, liberando así MMAE, lo que le permite ejercer su efecto citotóxico y eliminar las células tumorales.

Los términos "enlazador" y "conector" se usan indistintamente en esta solicitud para referirse a una fracción química que une covalentemente un anticuerpo a una sustancia terapéuticamente activa o a un ingrediente farmacéutico activo en una ADC. En una modalidad, el enlazador puede comprender residuos de aminoácidos que conectan el anticuerpo a la carga útil. Los residuos de aminoácidos pueden formar unidades de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapeptido. Los residuos de aminoácidos incluyen los que se producen de forma natural, así como los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina o los β -aminoácidos, como la β -alanina, o los ω -aminoácidos, como el ácido 4-amino-butírico.

Según la propiedad, los enlazadores adecuados para la presente invención pueden clasificarse en enlazadores degradables por la catepsina, como los enlazadores valina-citrulina (val-cit), los enlazadores cBu-Cit y los enlazadores CX; enlazadores no degradables, como los enlazadores SMCC o los enlazadores MD; enlazadores sensibles a los ácidos, enlazadores con estructura de silicona, enlazadores disulfuro-carbamato, enlazadores MC-GGFG, enlazadores TRX, enlazadores que contienen galactosida, enlazadores pirofosfato, enlazadores sensibles al infrarrojo cercano, enlazadores sensibles al ultravioleta, como PC4AP.

El enlazador de la presente invención también puede ser una combinación de uno o más enlazadores. Por ejemplo, un enlazador degradable por la catepsina puede combinarse con otros tipos de enlazadores para formar un nuevo enlazador. Por lo tanto, el "enlazador" descrito en la presente invención abarca un solo tipo de enlazador, o una combinación de diferentes tipos de enlazadores, siempre que sea capaz de acoplar el anticuerpo de la presente invención a un fármaco.

En una modalidad específica, el enlazador incluye pero no se limita a maleimido-hexanoil-valina-citrulina-p-aminobenzoiloxi (mc-vc-PAB), acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (AcLys-VC-PABC), amino PEG6-propionilo, maleimidocaproilo (mc), maleimidopropionilo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxicarbonilo (PAB), N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butirato (SPDB), N-succinimidil 3-(piridin-2-ylditio)-propionato (SPDP).

El término "carga" o "carga de fármaco" o "carga útil" se refiere al número medio de cargas útiles efectivas por anticuerpo dentro de una molécula de ADC ("carga útil" se usa indistintamente con "sustancia terapéuticamente activa o ingrediente farmacéutico activo" en el presente documento). La carga de fármaco puede oscilar entre 1 y 20 sustancias terapéuticamente activas o ingredientes farmacéuticos activos por anticuerpo. El término "relación fármaco/anticuerpo" o "DAR" se refiere a la relación entre la sustancia terapéuticamente activa o el ingrediente farmacéutico activo (D) conjugado con un anticuerpo y el anticuerpo. Los ADC descritos en el presente documento suelen tener una DAR de 1 a 20, y en ciertas modalidades tienen una DAR de 1 a 8, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 18, de 4 a 16, de 5 a 12, de 6 a 10, de 3 a 8, de 4 a 6, de 6 a 10, y de 2 a 4. El valor DAR representativo es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, generalmente expresado como una combinación de la letra D y un número, donde el número representa el valor numérico del DAR, por ejemplo, D2 representa la relación fármaco/anticuerpo, es decir, el valor DAR es 2. En algunas modalidades, el DAR es un DAR medio, es decir, caracterizado por un método de detección (*por ejemplo*, por métodos convencionales como espectroscopia UV/visible, espectrometría de masas, ensayo ELISA y HPLC). También pueden determinarse valores cuantitativos de DAR. La DAR puede estar limitada por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando el sitio de unión es cisteína tiol, el anticuerpo puede tener sólo uno o unos pocos grupos cisteína tiol o puede tener sólo uno o unos pocos grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede unirse la unidad enlazadora. En algunas modalidades, el valor DAR medio del conjugado de la invención es de 1 a 20, tal como de 2 a 18, de 4 a 16, de 5 a 12, de 6 a 10, de 2 a 8, de 3 a 8, de 2 a 6, de 4 a 6, de 6 a 10, tal como de 10 a 8.0, de 2.0 a 6.0, como 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9 o 10.0, y rangos con dos de estos valores como extremos.

El término "tratamiento" se refiere a ralentizar, interrumpir, bloquear, aliviar, detener, reducir o revertir la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente. Los efectos terapéuticos deseados incluyen, entre otros, prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, aliviar los síntomas, reducir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, reducir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad y aliviar o mejorar

el pronóstico. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o ralentizar su progresión.

El término "prevención" incluye la inhibición de la aparición o progresión de una enfermedad o trastorno o de los síntomas de una enfermedad o trastorno en particular. En algunas modalidades, los sujetos con antecedentes familiares de cáncer son candidatos a regímenes preventivos. En general, en el contexto del cáncer, el término "prevención" se refiere a la administración de un fármaco antes de la aparición de signos o síntomas de cáncer, especialmente en sujetos con riesgo de padecerlo.

El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad o dosis de un anticuerpo o conjugado o composición de la invención para producir el efecto deseado en un paciente que necesita tratamiento o prevención tras ser administrado a un paciente en dosis única o múltiple. El médico experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz, teniendo en cuenta diversos factores como la especie, el peso corporal, la edad y el estado general de salud de los mamíferos, la enfermedad específica implicada, el grado o la gravedad de la enfermedad, la respuesta del paciente individual, el anticuerpo específico que se va a administrar, el modo de administración, el perfil de biodisponibilidad del preparado que se va a administrar, el régimen de dosificación seleccionado y el uso de cualquier terapia concomitante.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para lograr el resultado terapéutico deseado, a las dosis necesarias y durante los periodos de tiempo necesarios. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o conjugado o composición del mismo puede variar en función de factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso corporal del individuo, y la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o conjugado o composición del mismo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" inhibe preferiblemente un parámetro medible (por ejemplo, la tasa de crecimiento tumoral, el volumen tumoral, etc.) en al menos un 20%, más preferiblemente en al menos un 40%, aún más preferiblemente en al menos un 50%, 60% o 70%, y aún más preferiblemente en al menos un 80% o 90% en relación con los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir un parámetro medible (*por ejemplo, el cáncer*) puede evaluarse en un sistema modelo animal en el que la eficacia en tumores humanos sea predictiva.

El término "cantidad preventivamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para lograr el resultado preventivo deseado, a las dosis necesarias y durante los periodos de tiempo necesarios. Típicamente, dado que una dosis preventiva se usa en sujetos antes o en un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad preventivamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una composición que permite que los ingredientes activos contenidos en ella estén en una forma de mantener su actividad biológica y no contenga ingredientes adicionales inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la composición.

II. Composiciones de la invención

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición que comprende cualquier anticuerpo anti-ROR1 descrito en el presente documento, o una molécula ADC del mismo, preferiblemente una composición farmacéutica. En una modalidad, la composición comprende además un adyuvante farmacéuticamente aceptable, tal como un portador farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, incluyendo una solución reguladora, conocido en la técnica. En una modalidad, la composición (*por ejemplo*, la composición farmacéutica) comprende un anticuerpo anti-ROR1 de la invención, o una molécula ADC del mismo, en combinación con uno o más agentes terapéuticos.

Tal como se usa aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes fisiológicamente compatibles, medios de dispersión, agentes isotónicos y agentes retardadores de la absorción, y similares.

Para el uso de adyuvantes farmacéuticamente aceptables, véase también "Handbook of Pharmaceutical Excipients", octava edición, R.C. Rowe, P.J. Seskey y S.C. Owen, Pharmaceutical Press, Londres, Chicago.

Las composiciones de la presente invención pueden presentarse en diversas formas. Estas formas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, como soluciones líquidas (*por ejemplo*, soluciones inyectables y soluciones infusibles), polvos o suspensiones, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración previsto y del uso terapéutico.

La vía de administración de la composición de la invención se basa en los métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral, mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular,

intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos implantados. En ciertas modalidades, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o por infusión continua o mediante un dispositivo de implante.

El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un primate, preferiblemente, un primate de orden superior, por ejemplo, un humano (por ejemplo, un individuo que tiene o corre el riesgo de tener una enfermedad descrita en el presente documento). En una modalidad, el sujeto padece o corre el riesgo de padecer una enfermedad descrita en el presente documento (por ejemplo, cáncer). En algunas modalidades, el sujeto está recibiendo o ha recibido otros tratamientos, como quimioterapia y/o radioterapia. En algunas modalidades, el sujeto ha recibido previamente o está recibiendo actualmente inmunoterapia.

Un medicamento que comprende el anticuerpo descrito en el presente documento puede prepararse mezclando el anticuerpo anti-ROR1 de la presente invención, o molécula ADC del mismo, que tenga una pureza deseada con uno o más adyuvantes opcionales farmacéuticamente aceptables, preferiblemente en forma de una preparación liofilizada o una solución acuosa.

La composición o formulación farmacéutica de la presente invención también puede contener más de un principio activo según se requiera para la indicación particular a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente entre sí. Por ejemplo, también es deseable proporcionar otros agentes terapéuticos, incluidos agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, citocinas, agentes citotóxicos, otros anticuerpos, fármacos de moléculas pequeñas o inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores o agonistas de puntos de control inmunitario), y similares. Los principios activos están convenientemente presentes en combinación en cantidades eficaces para el fin previsto.

Pueden prepararse preparados de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, y las matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas.

III. Preparación de anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco de la invención

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para preparar un

anticuerpo anti-ROR1, en donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-ROR1 o un vector de expresión que comprende el ácido nucleico en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-ROR1, y opcionalmente aislar el anticuerpo anti-ROR1. En cierta modalidad, el método comprende además recuperar el anticuerpo anti-ROR1 de la célula huésped (o del medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante del anticuerpo anti-ROR1 de la presente invención, primero se aísla un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-ROR1 de la presente invención y se inserta en un vector para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se aísla y secuenciar fácilmente mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas oligonucleótidas capaces de unirse específicamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-ROR1 de la invención.

Los presentes anticuerpos anti-ROR1 preparados como se describe en el presente documento pueden purificarse mediante técnicas conocidas en la técnica anterior, como cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, y similares. Las condiciones reales empleadas para purificar una proteína concreta también dependerán de factores como la carga neta, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, etc., que serán evidentes para los expertos en la materia. La pureza del anticuerpo anti-ROR1 de la invención puede determinarse por cualquiera de una variedad de métodos analíticos bien conocidos, incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel, cromatografía líquida de alto rendimiento, y similares.

En la técnica anterior se han descrito diversos métodos para conjugar agentes citotóxicos u otros agentes terapéuticos con anticuerpos. Por ejemplo, la conjugación puede producirse a través del grupo amino de las cadenas laterales de lisina y el grupo amino en el N-terminal del anticuerpo, el grupo carboxilo del ácido aspártico, el ácido glutámico y el C-terminal, o el grupo sulfhidrilo de cisteína activado en el anticuerpo.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra además de acuerdo con los siguientes ejemplos, sin embargo, debe entenderse que los ejemplos se describen de manera ilustrativa y no limitativa, y los expertos en la materia pueden realizar diversas modificaciones.

La presente invención se pondrá en práctica mediante métodos convencionales de química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, tecnología del

ADN recombinante, genética, inmunología y biología celular de la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario.

Ejemplo 1. Preparación y evaluación de las materias primas

1.1 Preparación y evaluación del anticuerpo de control ROR1

Preparación del anticuerpo de control ROR1: en la solicitud, el anticuerpo anti-ROR1 Cirmtuzumab se usa como anticuerpo de control positivo. El gen para el fragmento objetivo fue sintetizado por General Biotech Co., Ltd. según la secuencia descrita en WO/2019/173843. A continuación, el gen se clonó en el vector de expresión eucariota pcDNA3.4 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga. El vector de expresión de la proteína recombinante se transformó en *E. coli* DH5 α , se cultivó durante la noche a 37°C, y el ADN plasmídico se extrajo usando un kit de extracción de plásmidos sin endotoxinas (OMEGA, D6950-01). El vector de expresión obtenido, que expresa Cirmtuzumab, se designó con el número de clon 99961.1, y el Cirmtuzumab expresado se denominará 99961.1. El vector de expresión se transfectó en células 293 usando ExpiFectamine™ CHO Transfection Reagent (Thermo Fisher, A29129). Después de 7 días, se recogió el sobrenadante del cultivo celular, se centrifugó a 15,000 g durante 10 minutos y se filtró a través de una membrana de 0.22 μ m. El anticuerpo en el sobrenadante se purificó usando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A/G. El anticuerpo objetivo se eluyó con glicina 100 mM (pH 3.0) y luego se intercambió en solución reguladora PBS usando un tubo de ultrafiltración (Millipore, UFC901096).

Evaluación del anticuerpo de control ROR1: La actividad del anticuerpo de control positivo preparado 99961.1 (IgG1) se detectó con la proteína de antígeno huROR1-His adquirida (Kaixia Biotechnology, ROR-HM401). El método específico fue el siguiente: se recubrió una placa ELISA de 96 pocillos con huROR1-His (2 μ g/ml, 30 μ l/pocillo) a 4 °C durante toda la noche; después de lavarla tres veces, se bloqueó la placa con leche desnatada al 5% preparada en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora; después de lavarla tres veces, se añadió a la placa el anticuerpo de control 99961.1 diluido en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; después del lavado, se añadió a la placa el anticuerpo secundario Anti-human-IgG-Kappa+Lambda-HRP (Millipore, AP502P+AP506P) diluido en PBS (1:6000) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; a continuación, se lavó la placa seis veces y se añadió TMB para el desarrollo del color durante 5-20 min. Los datos se leyeron en OD450 con el lector de microplacas una vez finalizado el desarrollo del color, y los datos se procesaron y trazaron usando Prisma

Graphpad. Los resultados mostraron que el anticuerpo de control expresado 99961.1 podía unirse a la proteína ROR1 y tenía una actividad anti-ROR1 normal.

1.2 Preparación y evaluación de la proteína antigénica

Preparación de la proteína antígeno: Mediante manipulación genética a nivel del gen codificante, se añadió la etiqueta His o la etiqueta Fc humana (SEQ ID NO: 51) al C-terminal de las secuencias de la proteína ROR1 humana huROR1 ECD AA30-406 (Uniprot ID: Q01973), la proteína ROR1 de ratón MusROR1 ECD AA30-406 (Uniprot ID: Q9Z139), y la proteína ROR2 humana huROR2 ECD AA34-403 (Uniprot ID: Q01974). Las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas se construyeron en el vector pcDNA3.4, que luego se transformó en *Escherichia coli* DH5 α , se cultivó a 37°C durante la noche y, a continuación, se extrajo el plásmido usando un kit de extracción de plásmidos sin endotoxinas (OMEGA, D6950-01). El plásmido resultante se transfectó transitoriamente en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™) usando el kit de transfección ExpiFectamine™ 293 (Gibco™, A14524). Tras 7 días de expresión, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y la proteína que contenía Fc-marcado se sometió a purificación por afinidad usando COLUMN XK16/20 (Cytiva). Tras la purificación, la proteína objetivo se eluyó con 100 mM de glicina (pH=3.0), se concentró y se sometió a intercambio de solución reguladora, obteniéndose finalmente la proteína antígeno (huROR1-huFc). La proteína marcada con His se sometió a purificación por afinidad usando Perlas de Ni Smart 6FF (Changzhou Tiandi Renhe Biotechnology Co., Ltd., SA036050) y, a continuación, la proteína objetivo se eluyó usando un gradiente de imidazol. Las proteínas eluidas se colocaron respectivamente en solución reguladora PBS a través de tubos de concentración de ultrafiltración (Millipore, UFC901096), y finalmente se obtuvieron las proteínas antígeno (huROR1-His, MusROR1-His, huROR2-His).

Evaluación del antígeno: Los antígenos preparados (huROR1-His, huROR1-huFc) se detectaron usando el anticuerpo 99961.1 (IgG1) obtenido en el Ejemplo 1.1, que superó la inspección de calidad. El método específico fue el siguiente: La placa ELISA se recubrió con 2 μ g/ml de huROR1-His y huROR1-huFc respectivamente a 4°C durante la noche. Las proteínas de antígeno huROR1-His y huROR1-huFc adquiridas (Kaixia Biology, ROR-HM201) se utilizaron como controles positivos. Después de lavarla tres veces, se bloqueó la placa con leche desnatada al 5% preparada en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora; después de lavarla tres veces, se añadió a la placa el anticuerpo 99961.1 diluido en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; después de lavar, se añadió a la placa el anticuerpo secundario Anti-humano-IgG-Kappa+Lambda-HRP (Millipore,

AP502P+AP506P) diluido con PBS (1:6000) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; a continuación, se lavó la placa seis veces y se añadió TMB para el desarrollo del color durante 5-20 min. Los datos se leyeron en OD450 con el lector de microplacas una vez finalizado el desarrollo del color, y los datos se procesaron y representaron gráficamente usando Prisma Graphpad. Los resultados muestran que el anticuerpo 99961.1 puede unirse a los antígenos huROR1-His y huROR1-huFc expresados en casa con una afinidad comparable a la de la proteína antígeno ROR1 comprada.

Ejemplo 2. Construcción y evaluación de líneas celulares que sobreexpresan ROR1 humano

Construcción de la línea celular HEK293 que sobreexpresa ROR1 humano (en lo sucesivo huROR1-HEK293): La secuencia de ácido nucleico que codifica el ROR1 humano de longitud completa (Uniprot ID: Q01973) se construyó en el plásmido pLVX-puro (Clontech, Cat#632164). A continuación, el plásmido resultante se electroporó en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™) usando un electroporador (Invitrogen, Neon™ Transfection System, MP922947). Tras la electroporación, las células obtenidas se transfirieron a medio DMEM (Gibco, 11995065) con un 10% de FBS (Gibco, 15140-141) en volumen y sin antibióticos, y a continuación se transfirieron a placas de cultivo celular de 10×10 cm para su cultivo durante 48 horas. A continuación, las células se distribuyeron en placas de cultivo celular de 96 pocillos a una densidad media de 10⁴ células/pocillo, y se añadió puomicina a una concentración final de 2 µg/ml para la presión de cribado. Al cabo de unas 2 semanas, se recogieron las líneas celulares que formaban clones para su identificación.

Ensayo de citometría de flujo de células huROR1-HEK293: Las líneas celulares obtenidas anteriormente en fase de crecimiento logarítmico se digirieron y se sembraron en placas de 96 pocillos. Tras lavarlas con solución reguladora FACS (solución reguladora PBS 1× con un 2% de FBS en volumen), se añadió el anticuerpo primario (99961.1) gradiente diluido en PBS y se incubó a 4°C durante 30 min. Tras el lavado, se añadió el anticuerpo secundario fluorescente preparado anti-IgG humana Fc (abcam, 98596) y se incubó a 4°C durante 30 min. Por último, las células se detectaron mediante citómetro de flujo (Beckman, CytoFLEXAOO-1-1102). Los resultados muestran que se obtuvo una línea celular huROR1-HEK293 con alta expresión de ROR1 humano en la superficie.

Ejemplo 3 Inmunización animal y construcción de una biblioteca inmunológica

3.1 Régimen de vacunación

Tres ratones Balb/C (Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd.) fueron inmunizados de forma cruzada con antígenos huROR1-huFc y huROR1-His mediante inyección subcutánea e intraperitoneal, una vez cada dos semanas, para un total de cuatro inmunizaciones. Una semana después de la cuarta inmunización, se extrajo sangre de los ratones para realizar un ensayo de título inmunitario y, por último, se usó huROR1-huFc para una inmunización potenciadora.

3.2 Evaluación de los títulos de anticuerpos séricos en ratones tras la inmunización

La placa ELISA se recubrió con 2 µg/ml de huROR1-His y huROR1-huFc respectivamente a 4°C durante toda la noche (30µl/pocillo). Después de lavarla tres veces, se bloqueó la placa con leche desnatada al 5% preparada en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora; después de lavarla tres veces, se añadió a la placa gradiente de suero de ratón diluido en PBS, y se añadió el anticuerpo 99961.1 como control positivo, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; tras el lavado, se añadió a la placa el anticuerpo secundario Cabra-anti-ratón-IgG(1+2a+2b+3)-HRP (Jackson, 115-035-164) o Cabra-anti-humano-Kappa+Lambda-HRP (Millipore, AP502P+AP506P) diluido en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; a continuación, se lavó la placa seis veces y se añadió TMB para el desarrollo del color durante 5-20 min. Los datos se leyeron en OD450 con el lector de microplacas una vez finalizado el desarrollo del color, y los datos se procesaron y trazaron usando Prism de Graphpad. Los resultados mostraron que los títulos séricos de los tres ratones cumplían las normas.

3.3 Construcción de la biblioteca de genes de anticuerpos mediante despliegue de fagos

Una vez finalizada la inmunización, se extrajeron los bazo de los ratones y se recogieron los esplenocitos después de triturarlos y filtrarlos. Se añadió 1 ml de reactivo TRIzol™ (Thermo Fisher, 15596026) para lisar los esplenocitos y se extrajo el ARN total por el método del fenol-cloroformo. Los ARN extraídos se transcribieron inversamente en ADNc mediante un kit de transcripción inversa (TaKaRa, 6210A). A continuación, los ADNc se utilizaron como plantillas de PCR y se emplearon cebadores específicos para las secuencias de anticuerpos de ratón para amplificar los genes de la región variable de la cadena ligera y pesada del anticuerpo, respectivamente. El producto de la PCR se digirió con dos enzimas NcoI y NotI para obtener los fragmentos del gen del anticuerpo, que se insertaron en el vector de visualización de fagos y se ligaron con ligasa T4. Los productos

de ligación se recuperaron usando un kit de recuperación de ADN (Omega, D6492-02) y finalmente se transformaron en *Escherichia coli* SS320 competente (Lucigen, MC1061F) usando Electroporator (Bio-Rad, MicroPulser). Las bacterias electroporadas se extendieron en una placa sólida 2-YT (C /K⁺⁺ 2-YT) que contenía ampicilina y tetraciclina, y las bacterias SS320 que se transformaron correctamente con el plásmido de anticuerpos se amplificaron y empaquetaron usando el fago ayudante VSCM13 (adquirido a Stratagene) para obtener una biblioteca de visualización de fagos que contenía secuencias Fab.

Ejemplo 4 Cribado de la biblioteca de genes de anticuerpos por despliegue de fagos

4.1 Cribado celular de la biblioteca génica de anticuerpos desplegada por fagos

Las células hROR1-HEK293T se cultivaron en matraces T25. Cuando la densidad de crecimiento celular se aproximó al 90%, se eliminó el sobrenadante del cultivo y las células se lavaron una vez con PBS (Yuanpei, B310KJ), después se añadieron 2 ml de paraformaldehído al 4% (Shenggong, E672002-0500) para su fijación durante 0,5 h, y finalmente se lavaron dos veces con PBS y se utilizaron como materia prima para el cribado. Durante el cribado, la biblioteca de visualización de fagos se incubó con células hROR1-HEK293T fijadas a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavó tres veces con 1×PBS y, a continuación, se añadieron 2 ml de glicina-HCl (pH=2.0) y se mezclaron suavemente durante 10 minutos para eluir el fago que se une específicamente a ROR1 humano. A continuación, el sobrenadante eluido infectó bacterias SS320 en fase logarítmica (Lucigen, 60512-1), se dejó reposar durante 30 minutos y se cultivó a 37°C, 220 rpm durante 1 hora. Se añadió el fago ayudante VSCM13, se dejó reposar 30 minutos y se siguió cultivando a 37°C, 220 rpm durante 1 hora. Tras la centrifugación, las células se transfirieron al medio C⁺ /K⁺ 2-YT. El fago final se usó para la segunda ronda de cribado. El cribado se repitió varias veces, y en cada ronda se seleccionaron aleatoriamente 10 clones para el análisis de secuencias con el fin de evaluar la biblioteca. Tras tres rondas de cribado, las secuencias de la biblioteca se enriquecieron significativamente.

4.2 Cribado basado en inmunotubos y en microesferas magnéticas de la biblioteca de visualización de fagos de genes de anticuerpos

El inmunotubo y la perla magnética se utilizaron para enriquecer anticuerpos específicos contra antígenos, y ambos métodos se complementaron y verificaron mutuamente.

El cribado basado en inmuntubos es un proceso de paneo, que consiste en recubrir la proteína antígeno huROR1-His o huROR1-huFc en la superficie de un inmuntubo con alta capacidad de adsorción, añadir la biblioteca de anticuerpos de visualización de fagos al inmuntubo para incubar con la proteína antígeno adsorbida en la superficie del inmuntubo, lavar y eluir. Tras 2-4 rondas de lavado, finalmente se enriquece el anticuerpo monoclonal Fab específico contra el antígeno. En este ejemplo, el anticuerpo monoclonal Fab contra ROR1 humano se enriqueció después de tres rondas de paneo. Para el método específico, consulte el Ejemplo 2.4.2 de la patente CN112250763B.

El cribado basado en microesferas magnéticas es un proceso de barrido que consiste en marcar la proteína antígeno huROR1-His con biotina, unir la proteína antígeno marcada con microesferas magnéticas acopladas con estreptavidina, incubar las microesferas magnéticas unidas al antígeno con la biblioteca de genes de anticuerpos, lavar y eluir. Normalmente, el anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno puede enriquecerse en grandes cantidades mediante 3-4 rondas de paneo. En este ejemplo, se usó huROR1-His marcado con biotina para el cribado de la biblioteca de visualización de fagos, y el anticuerpo monoclonal Fab contra ROR1 humano se cribó principalmente después de tres rondas de cribado. Para el método específico, consulte el Ejemplo 2.4.1 de la patente CN112250763B.

4.3 Selección de clones individuales

El pool de fagos eluido en cada ronda se analizó mediante ELISA para evaluar el efecto de enriquecimiento, y se seleccionaron aleatoriamente 10 clones del pool de fagos en cada ronda de cribado para el análisis de secuencias. El efecto de enriquecimiento y la proporción de repetibilidad de la secuenciación se analizaron exhaustivamente para seleccionar la ronda adecuada para la selección de un solo clon.

La proteína antígeno huROR1-His se usó para el cribado primario monoclonal ELISA, y el anticuerpo Fab que se une a huROR1-His obtenido del cribado primario se preparó como lisado Fab, y luego las células HEK293 de sobreexpresión de huROR1 preparadas en el Ejemplo 2.1 se utilizaron para la detección y verificación por citometría de flujo (FACS, por sus siglas en inglés). Se examinaron un total de 11 moléculas Fab de anticuerpos que se unen específicamente a ROR1 humano, y los 11 Fab de anticuerpos de ratón obtenidos se denominaron según los números de clon correspondientes (B62, B31, B32, B74, B34, B39, C38, C77, C42, M71 y M78). Los resultados FACS específicos se muestran en las Figuras 1A-1B. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de aminoácidos CDR de los Fabs de anticuerpos de ratón obtenidos. Las secuencias CDR se determinan

usando la definición AbM.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de las regiones CDR de los anticuerpos murinos

Clon No.	SEQ ID NO	Secuencia	
B62	1	HCDR1	GFTFSSYVMS
	2	HCDR2	TINSNGGNTY
	3	HCDR3	DSLGLRRRDYAMDY
	28	LCDR1	VTSIDIDDDVN
	29	LCDR2	AGNTLRP
	30	LCDR3	LQSDNLPYT
B31	4	HCDR1	GFTFSRYAMS
	5	HCDR2	SISRGGSTY
	6	HCDR3	YFGNYDAMDY
	31	LCDR1	KASQDINNYVS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
B32	7	HCDR1	GFAFSSYAMS
	8	HCDR2	SINRDVTTY
	9	HCDR3	GYYYGGGPYWHFDV
	34	LCDR1	KASQDINSYLT
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
B74	10	HCDR1	GFTFSIYAMS
	11	HCDR2	SISGGGTAY
	12	HCDR3	GYYYGGSPYWHFDV
	35	LCDR1	KASQDINSYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	36	LCDR3	LQIDFPYT
B34	4	HCDR1	GFTFSRYAMS
	13	HCDR2	SISTGGSPY
	14	HCDR3	GYYNNSPHWYFAV
	35	LCDR1	KASQDINSYLS

Clon No.	SEQ ID NO	Secuencia	
	32	LCDR2	RANRLVD
	37	LCDR3	LQYDEFPYT
B39	15	HCDR1	GFTFSTYAMS
	16	HCDR2	SISTGASTY
	17	HCDR3	EETTTAALYYAMDY
	38	LCDR1	KASQDINNYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
C38	18	HCDR1	GFTFSSYAMS
	8	HCDR2	SINRDVTTY
	19	HCDR3	DYYYGSSLYYGMDY
	31	LCDR1	KASQDINNYVS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
C77	20	HCDR1	GFSFSNYAMS
	21	HCDR2	SINSGVTTY
	12	HCDR3	GYYYGGSPYWHFDV
	31	LCDR1	KASQDINNYVS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
C42	22	HCDR1	GFTFSNYIMS
	23	HCDR2	TINSGGTNTY
	24	HCDR3	YNGNYVWFAY
	39	LCDR1	SASSVSFIY
	40	LCDR2	DTSNLAS
	41	LCDR3	QQWSNYHFT
M71	4	HCDR1	GFTFSRYAMS
	25	HCDR2	SINRGGTTY
	26	HCDR3	DYYYGSSLYNGMDF
	35	LCDR1	KASQDINSYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT

Clon No.	SEQ ID NO	Secuencia	
M78	18	HCDR1	GFTFSSYAMS
	25	HCDR2	SINRGGTTY
	27	HCDR3	DYYYGSNLYNGMDY
	35	LCDR1	KASQDINSYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT

Ejemplo 5 Construcción, expresión y purificación del anticuerpo

5.1 Construcción del plásmido

La secuencia codificante VH de la secuencia Fab de los anticuerpos monoclonales seleccionados B62, B31, B32, B74, B34, B39, C38, C77, C42, M71 y M78 se conectó a la secuencia codificante de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 52) para obtener la secuencia codificante de la cadena pesada del anticuerpo quimérico, y la secuencia codificante VL de la secuencia Fab se conectó a la secuencia codificante del tipo kappa (SEQ ID NO: 53) de la región constante de la cadena ligera humana (CL, por sus siglas en inglés) para obtener la secuencia codificante de la cadena ligera del anticuerpo quimérico. La secuencia codificadora de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se insertó respectivamente en el plásmido vector de expresión eucariota pcDNA3.4 (Invitrogen), se transformó en *Escherichia coli* DH5α y se cultivó a 37°C durante la noche. El plásmido se extrajo usando un kit de extracción de plásmidos sin endotoxinas (OMEGA, D6950-01) para obtener un plásmido de anticuerpos sin endotoxinas para la expresión eucariota.

5.2 Expresión y purificación del anticuerpo

La secuencia de longitud completa del anticuerpo obtenido anteriormente se expresó mediante el sistema de expresión transitoria Expi CHO (Thermo Fisher, A29133). El método específico fue el siguiente: el día de la transfección, la densidad de células CHO era de aproximadamente 7×10^6 a 1×10^7 células viables/ml, y la tasa de supervivencia celular era >98%. En ese momento, las células se ajustaron a una concentración final de 6×10^6 células/ml usando medio de expresión ExpiCHO fresco precalentado a 37°C. El plásmido objetivo se diluyó con OptiPRO™ SFM preenfriado a 4°C (se añadió 1 µg de plásmido a 1 ml del medio de cultivo), y el reactivo ExpiFectamine™ CHO se diluyó con OptiPRO™ SFM. Ambos se mezclaron en volúmenes iguales y se mezclaron suavemente

mediante pipeteo, obteniéndose la mezcla ExpiFectamine™ CHO/ADN plasmídico, que se incubó a temperatura ambiente durante 1-5 min, se añadió lentamente a la suspensión celular preparada agitando suavemente y, por último, se colocó en un agitador de cultivo celular y se cultivó a 37°C, 8% de CO₂.

18-22 horas después de la transfección, se añadieron al medio de cultivo los reactivos Mejorador ExpiCHO™ y Alimentación ExpiCHO™, y se colocó el matraz en un agitador a 32°C con un 5% de CO₂ para continuar el cultivo. El día 5 después de la transfección, se añadió lentamente el mismo volumen de reactivo Alimentación ExpiCHO™ y se mezcló suavemente la suspensión celular. Siete días después de la transfección, se recogió el sobrenadante del cultivo celular que expresaba la proteína objetivo y se centrifugó a 15,000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se sometió a purificación por afinidad usando MabSelect SuRe LX (GE, 17547403), y a continuación la proteína objetivo se eluyó con acetato sódico 100 mM (pH 3.0), seguido de neutralización con Tris-HCl 1 M, y finalmente la proteína resultante se colocó en solución reguladora PBS usando tubos de concentración de ultrafiltración (Millipore, UFC901096).

Ejemplo 6 Propiedades físicas y químicas del anticuerpo

En este ejemplo, el peso molecular relativo y la pureza de los anticuerpos obtenidos anteriormente se detectaron mediante SDS-PAGE y SEC-HPLC.

6.1 Evaluación del anticuerpo por SDS-PAGE

Preparación de la solución no reductora: Se añadieron por separado 1 µg de cada anticuerpo obtenido y del producto de control de calidad IPI (Ipilimumab) a la solución reguladora de carga 5×SDS y 40 mM de yodoacetamida, se calentaron en un baño seco a 75 °C durante 10 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min para obtener el sobrenadante.

Preparación de la solución reductora: se añadieron por separado 2 µg de cada anticuerpo obtenido y del producto de control de calidad IPI a la solución reguladora de carga 5×SDS y 5 mM de DTT, se calentaron en un baño seco de 100°C durante 10 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min para obtener el sobrenadante. El sobrenadante se añadió a un gel de gradiente Bis-tris 4-15% (GenScript) para electroforesis en gel y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie.

El gel de proteínas con bandas de proteínas cromogénicas se escaneó con el

escáner en color EPSON V550 (se decoloró hasta que el fondo del gel fue transparente), y la pureza de las bandas reducidas y no reducidas se calculó con ImageJ según el método de normalización del área del pico.

Los resultados muestran que las bandas de cada anticuerpo en el gel no reductor eran de alrededor de 150kD, y las bandas en el gel reductor eran de alrededor de 55kD y 25kD, que coincidían con el tamaño esperado. La pureza de todos los anticuerpos obtenidos en esta aplicación detectados mediante gel reductor fue superior al 95% (Tabla 2).

6.2 Evaluación de la pureza de los monómeros de anticuerpos mediante SEC-HPLC

Preparación de los materiales: 1. Fase móvil: Solución reguladora de fosfato 150 mmol/L, pH 7.4; 2. Preparación de la muestra: Cada anticuerpo y el producto de control de calidad IPI se diluyeron a 0,5 mg/ml con solución de fase móvil, respectivamente. Se usó el cromatógrafo de líquidos Agilent HPLC 1100 o Shimadzu LC2030C PLUS, la columna fue XBridge BEH (SEC 3.5 μ m, 7.8 mm D.I.×30 cm), el caudal de Waters se ajustó a 0.8 ml/min, el volumen de inyección fue de 20 μ l, las longitudes de onda del detector VWD fueron 280 nm y 214 nm. La solución en blanco, la solución de control de calidad IPI y la solución de muestra de anticuerpo se inyectaron secuencialmente. Los porcentajes de polímeros de alto peso molecular, monómeros de anticuerpos y sustancias de bajo peso molecular en las muestras se calcularon según el método de normalización de áreas.

Los resultados se muestran en las Figuras 2A-2K y en la tabla 2. Excepto en el caso del anticuerpo B74, la pureza del monómero SEC de los demás anticuerpos fue superior al 96%.

Tabla 2 Niveles de expresión y propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos obtenidos en esta aplicación

Clon No.	SDS-PAGE (%)	SEC-HPLC (%)
99961.1	>95.0	98.68
B31	>95.0	96.45
B62	>95.0	99.1
B32	>95.0	98.79
B34	>95.0	99.29
B39	>95.0	98.6

B74	>95.0	Forma anormal del pico
C38	>95.0	98.9
C42	>95.0	99.39
C77	>95.0	100
M71	>95.0	100
M78	>95.0	98.93

Ejemplo 7 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo al antígeno

En este ejemplo, los perfiles de unión de 11 anticuerpos (B62, B31, B32, B34, B39, B74, C38, C42, C77, M71 y M78) a la proteína antígeno ROR1 humana huROR1-His se detectaron mediante el ensayo ELISA, y las capacidades de unión de los anticuerpos (B62, B31, B32, B34, B39, B74, C38, C42, C77, M71 y M78) a las células huROR1-HEK293 que sobreexpresan ROR1 humano y a las células tumorales A549 también se detectaron mediante el ensayo FACS. Las células tumorales A549 son una línea celular humana de cáncer de pulmón no microcítico que sobreexpresa ROR1 humano.

7.1 Evaluación de la capacidad de unión del anticuerpo a la proteína antígeno huROR1-His mediante ensayo ELISA

La placa ELISA de 96 pocillos se recubrió con 2 µg/ml de huROR1-His (30 µl/pocillo) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, la placa se lavó tres veces con PBST y después se bloqueó con leche desnatada al 5% durante 2 h. Tras lavar con PBST tres veces, se añadió la solución de dilución en gradiente (3.00000, 0.33333, 0.11111, 0.03704, 0.01235, 0.00412, 0.00046, 0.00005 µg/ml) de cada anticuerpo y el anticuerpo de control positivo 99961.1 y se incubaron durante 1 h. Tras lavar con PBST tres veces, se añadió el anticuerpo secundario Goat-anti-human Fc-HRP (abcam, ab97225) y se incubó durante 1 h. Tras la incubación, se lavó la placa con PBST seis veces y se añadió TMB (SurModics, TMBS-1000-01) para el revelado del color. Según los resultados del desarrollo del color, se añadió HCl 2 M para terminar la reacción, y los datos se leyeron en OD450 usando un lector de microplacas (Molecular Devices, SpecterMax 190).

Los resultados se muestran en las Figuras 3A-3B. Todos los anticuerpos obtenidos en la presente solicitud tienen una buena actividad de afinidad con la proteína antígeno huROR1-His, y la afinidad de cada anticuerpo es equivalente a 99961.1.

7.2 Evaluación de la capacidad de unión del anticuerpo a las células tumorales

huROR1-HEK293 y A549 mediante FACS

En este ejemplo, la actividad de unión del anticuerpo se evaluó usando dos tipos de células, células huROR1-HEK293 sobreexpresantes de ROR1 humano y células tumorales A549.

El método específico fue el siguiente: se prepararon células huROR1-HEK293 o células A549 en fase de crecimiento logarítmico hasta obtener una suspensión unicelular, se ajustó la densidad a 1×10^6 células/ml y, a continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de células a una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se centrifugaron a 4 °C, 300 g y se eliminó el sobrenadante. La solución de dilución en gradiente de los anticuerpos obtenidos en esta aplicación y el anticuerpo de control positivo 99961.1 se añadieron a los pocillos correspondientes, se mezclaron bien y se incubaron a 4°C durante 30 min. Tras la incubación, la mezcla celular se lavó tres veces y, a continuación, se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario diluido 1:300 Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG-Fc (abcam, ab98596). La mezcla se incubó a 4 °C en la oscuridad durante 30 min. Tras tres lavados, las células se detectaron mediante citometría de flujo (Beckman, CytoFLEX AOO-1-1102).

Los resultados se muestran en la Figura. En las células A549 (Figuras 4A-4B), excepto C42, todos los demás anticuerpos tienen una afinidad superior a la del anticuerpo de control 99961.1; en las células huROR1-HEK293 (Figuras 5A-5B), todos los anticuerpos tienen una afinidad comparable a la del anticuerpo de control 99961.1.

Ejemplo 8 Evaluación de la reactividad cruzada del anticuerpo entre especies y grupos homólogos

En este ejemplo, se comprobó la reactividad cruzada de cada uno de los anticuerpos obtenidos en la presente solicitud entre especies y grupos homólogos. La reactividad cruzada de los anticuerpos obtenidos en la presente solicitud entre especies y grupos homólogos se identificó con la proteína antígeno ROR1 de ratón MusROR1-His y la proteína antígeno ROR2 humana huROR2-His preparadas en el Ejemplo 1.2.

8.1 Evaluación de la reactividad cruzada de los anticuerpos entre especies.

Se recubrió una placa ELISA de 96 pocillos con 2 µg/ml de MusROR1-His (30 µl/pocillo) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, la placa se lavó tres veces con PBST y después se bloqueó con leche desnatada al 5% durante 2 h. Tras lavar con PBST tres veces, se añadió la solución de dilución en gradiente (1.00000, 0.11111, 0.03704, 0.01235, 0.00412, 0.00137, 0.00015, 0.00002 µg/ml) de cada anticuerpo y el anticuerpo de

control positivo 99961.1 y se incubaron durante 1 h. Tras lavar con PBST tres veces, se añadió el anticuerpo secundario Goat-anti-human Fc-HRP (abcam, ab97225) y se incubó durante 1 h. Tras la incubación, se lavó la placa con PBST seis veces y se añadió TMB (SurModics, TMBS-1000-01) para el revelado del color. Según los resultados del desarrollo del color, se añadió HCl 2 M para terminar la reacción, y los datos se leyeron en OD450 usando un lector de microplacas (Molecular Devices, SpecterMax 190).

Los resultados se muestran en las Figuras 6A-6B y en la Tabla 3. B62, B32, C38 y C42 se unen a la proteína antígeno MusROR1-His y muestran una buena reactividad cruzada con el ratón. Los demás anticuerpos y el anticuerpo de control positivo 99961.1 no se unen a la proteína antígeno de ratón. Por lo tanto, los anticuerpos B62, B32, C38 y C42 obtenidos en la presente solicitud tienen una amplia gama de usos en experimentos y ensayos basados en modelos de ratón.

8.2 Evaluación de la reactividad cruzada del anticuerpo de la presente solicitud entre grupos homólogos

La placa ELISA de 96 pocillos se recubrió con 2 µg/ml de huROR2-His (30 µl/pocillo) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, la placa se lavó tres veces con PBST y después se bloqueó con leche desnatada al 5% durante 2 h. Tras lavar con PBST tres veces, se añadió la solución de dilución en gradiente del anticuerpo y del anticuerpo de control positivo 99961.1 y se incubó durante 1 h. Tras tres lavados con PBST, se añadió el anticuerpo secundario Goat-anti-human Fc-HRP (abcam, ab97225) y se incubó durante 1 h. Tras la incubación, se lavó la placa con PBST durante 6 veces y se añadió TMB (SurModics, TMBS-1000-01) para el revelado del color. Según los resultados del desarrollo del color, se añadió HCl 2 M para terminar la reacción, y los datos se leyeron en OD450 usando un lector de microplacas (Molecular Devices, SpecterMax 190).

Los resultados se muestran en las Figuras 7A-7B y en la Tabla 3. Ninguno de los anticuerpos se une a la proteína antígeno huROR2-His, lo que indica que los anticuerpos preparados en la presente solicitud pueden unirse específicamente a ROR1 humano.

Tabla 3 Actividad cruzada del anticuerpo obtenido en esta aplicación entre especies y grupos homólogos

Clon No	Especie	MusROR1-His	huROR2-His
B31	murino	no vinculante	no vinculante
B62	murino	vinculante	no vinculante
B32	murino	vinculante	no vinculante

B34	murino	no vinculante	no vinculante
B39	murino	no vinculante	no vinculante
B74	murino	no vinculante	no vinculante
C38	murino	vinculante	no vinculante
C42	murino	vinculante	no vinculante
C77	murino	no vinculante	no vinculante
M71	murino	no vinculante	no vinculante
M78	murino	no vinculante	no vinculante

Ejemplo 9 Evaluación de la tasa de internalización del anticuerpo

En este ejemplo, la tasa de internalización de los anticuerpos obtenidos en esta solicitud se detectó usando dos métodos de detección, FACS y Fab-Zap. La detección de internalización basada en FACS detecta la tasa de internalización de anticuerpos en un corto período de tiempo mediante el uso de células de unión a anticuerpos sobresaturadas; y el método Fab-Zap refleja el efecto acumulativo a largo plazo de la tasa de internalización mediante la unión de células con diferentes concentraciones de anticuerpos conjugados con toxinas Fab-Zap, y la muerte de las células objetivo por las toxinas que entran en las células a través de la internalización.

9.1 Evaluación de la tasa de internalización del anticuerpo de la presente solicitud mediante ensayo FACS

Dilución del anticuerpo: El anticuerpo de prueba se diluyó con medio completo DMEM hasta una concentración final de 10.0000 µg/ml.

Tratamiento celular: se digirieron células huROR1-HEK293 y se añadieron a medio DMEM completo. Después de mezclarlas bien, se contaron las células y se determinó su viabilidad. Se tomaron 10^6 células y se añadieron a tubos de centrifuga de 1,5 ml, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante, se usó 1 ml de medio DMEM preenfriado para la resuspensión, se centrifugó a 300 g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante.

Incubación del anticuerpo primario: Se tomaron 1000 µl del anticuerpo diluido previamente enfriado y se añadieron al tubo de centrifuga que contenía células para preparar la suspensión anticuerpo-célula, que se añadió a una placa de 96 pocillos y se incubó a 4°C.

Incubación de anticuerpos secundarios extracelulares: La suspensión en la placa de 96 pocillos se transfirió rápidamente a una segunda placa de 96 pocillos. Se añadieron 180

μl de solución reguladora FACS preenfriado a cada pocillo de la segunda placa de 96 pocillos y se lavaron dos veces. A continuación, se añadieron 100 μl de anticuerpo secundario diluido marcado con FITC anit-huFc o anit-huFc marcado con RPE (el anticuerpo secundario se diluyó 1:150 usando solución reguladora FACS) a cada pocillo; se incubó a 4 °C durante 30 min.

Fijación celular: Tras la incubación, se descartó el sobrenadante por centrifugación, se añadieron 180 μl de solución reguladora FACS preenfriado a cada pocillo y se lavaron las células dos veces. El sobrenadante se eliminó por centrifugación, y las células se fijaron con 100 μl de paraformaldehído al 4% en cada pocillo durante 30 min a temperatura ambiente.

Disrupción de la membrana celular: Tras la fijación, se añadieron 180 μl de solución reguladora FACS y se lavaron dos veces. Se añadieron 100 μl de Tritón X-100 al 0.5% precalentado a cada pocillo y se permeabilizaron durante 5 min a temperatura ambiente.

Incubación intracelular de anticuerpos secundarios: Tras lavar la placa de 96 pocillos, se añadieron 180 μl de solución reguladora de permeabilización precalentado (Invitrogen™ eBioscience™, 00-8333-56) a cada pocillo y se lavaron dos veces. Se añadieron 100 μl de anticuerpo secundario diluido RPE-etiquetado con anit-huFc (diluido 1:150 usando solución reguladora Perm) a cada pocillo, y a incubar a temperatura ambiente durante 60 min.

Detección por fluorescencia: Tras lavar la placa de 96 pocillos, se utilizaron 100 μl de solución reguladora FACS para la resuspensión, y la detección se realizó mediante citometría de flujo.

En el ejemplo se utilizaron dos grupos de diferentes configuraciones de fluorescencia para teñir cada muestra. El primer grupo se configuró como FITC+PE, es decir, el anticuerpo secundario FITC se usó primero para teñir el anticuerpo primario extracelular y, a continuación, el anticuerpo secundario PE se usó para teñir el anticuerpo primario intracelular después de permeabilizar la membrana. En este grupo, PE era la señal intracelular y FITC era la señal extracelular. El segundo grupo se estableció como PE+PE, es decir, primero se usó el anticuerpo secundario PE para teñir el anticuerpo primario extracelular y, a continuación, se usó el anticuerpo secundario PE para teñir el anticuerpo primario intracelular después de permeabilizar la membrana. En este grupo, el PE era la suma de las señales intracelular y extracelular. Al mismo tiempo, ambos grupos de muestras se detectaron usando los canales FITC y PE, y los valores de la tasa de internalización se calcularon como valores de detección para el canal PE. La fórmula específica es:

Tasa de internalización = grupo 1 (FITC+PE) canal PE/grupo 2 (PE+PE) canal PE × 100%.

Los resultados se muestran en las Figuras 8A-8B. Los resultados de este ejemplo muestran que, para todos los anticuerpos preparados en esta solicitud, la tasa de internalización es mejor que la del anticuerpo de control 99961.1 en un corto periodo de tiempo (en 3 horas).

9.2 Evaluación de la tasa de internalización del anticuerpo por el método Fab-Zap

La actividad de internalización de los anticuerpos se detectó en este experimento usando la citotoxicidad de la internalización de Fab-ZAP mediada por anticuerpos. Fab-ZAP es un fragmento Fab unido a saporina, un inhibidor ribosomal que puede inhibir la síntesis de proteínas y causar la muerte celular. El Fab-ZAP utilizado en este experimento es un fragmento Fab que puede unirse al Fc humano del anticuerpo quimérico. Tras la incubación con el anticuerpo quimérico, Fab-ZAP hace que el anticuerpo quimérico sea portador de la toxina. Cuando el anticuerpo quimérico se internaliza, la toxina entra en la célula junto con el anticuerpo quimérico, lo que provoca la muerte celular. A continuación, se detecta la actividad de la célula mediante MTS (Promega, G3580) para determinar si el anticuerpo está internalizado.

Los procedimientos experimentales detallados fueron los siguientes: en primer lugar, Fab-Zap se diluyó a 0.4 nM con medio completo DMEM y, a continuación, cada uno de los anticuerpos obtenidos en la aplicación y el anticuerpo de control positivo se diluyeron gradualmente (0.020000, 0.006667, 0.002222, 0.000741, 0.000247, 0.000082, 0.000027, 0.000009 µg/ml) con el Fab-Zap a 0.4 nM para preparar soluciones de dilución de anticuerpos. Las células huROR1-HEK293 en fase de crecimiento logarítmico se convirtieron en una suspensión unicelular, la densidad se ajustó a 6×10^6 células/ml, y se inocularon 50 µl en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. A continuación, se tomó la dilución de anticuerpo anterior y se añadió a la placa de cultivo celular, 50 µl por pocillo, y se mezcló bien la suspensión mediante pipeteo. La placa de cultivo celular se colocó en un incubador de cultivo celular a 37 °C y se incubó durante 48 horas. Tras la incubación, se añadieron 7,5 µl de solución de TritonX-100 a cada pocillo, se mezclaron suavemente mediante golpecitos y la placa de cultivo celular se colocó en una incubadora de cultivo celular a 37°C durante 0,5 h. A continuación, se añadieron 20 µl de MTS a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 1-4 horas. Por último, la placa de cultivo celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, y los datos se leyeron con un lector de microplacas a una

longitud de onda de detección de A492.

Los resultados se muestran en las Figuras 9A-9F, indicando que en las condiciones de concentración de anticuerpos especificadas en este ejemplo, el efecto de internalización de los anticuerpos preparados en la presente solicitud es equivalente al del anticuerpo de control. Considerando que las células mostrarán una reacción sensible a las toxinas sólo por encima de un cierto umbral, es más difícil ampliar la diferencia cuando hay poca diferencia en las toxinas acumuladas.

Ejemplo 10 Evaluación de la cinética de afinidad (Gator) del anticuerpo

En este ejemplo, la afinidad de los anticuerpos obtenidos en la presente solicitud y el anticuerpo de control positivo 99961.1 a la proteína antígeno huROR1-His se detectó basándose en el dispositivo Gator.

En primer lugar, se preparó el tampón Q con PBS (10 mM pH7,4) (sin IgG, adquirido a Jackson ImmunoResearch Lab) + 0.02% Tween 20 (adquirido a Thermo) + 0.2% BSA (adquirido al cultivo de origen). La solución madre del anticuerpo de prueba se diluyó con el tampón Q preparado hasta obtener una solución de trabajo con una concentración final de 30 nM; la solución madre de la proteína antígeno huROR1-His se preparó con el tampón Q hasta obtener una solución de trabajo con diluciones múltiples (480, 240, 120, 60, 30, 15, 7.5 nM), y se realizó la detección y el análisis. 5 nM), y a continuación se realizó la detección y el análisis con el instrumento Gator y el software que lo acompaña, seleccionando el modo experimental Cinética Avanzada. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Los resultados muestran que, excepto el anticuerpo C42, que tiene una afinidad comparable a la del anticuerpo de control 99961.1, todos los demás anticuerpos tienen una afinidad superior a la del anticuerpo de control 99961.1 en un orden de magnitud o más. Entre ellos, el anticuerpo B62 tiene una afinidad de 9,84E-10, superior a la del anticuerpo de control 99961.1 en aproximadamente dos órdenes de magnitud.

Tabla 4 Resultado de la prueba cinética de afinidad del anticuerpo obtenido en esta aplicación

Clon No.	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	R ²	Rmax (nm)
99961.1	1.35E-08	5.29E+05	7.12E-03	0.995	0.669
B31	5.67E-09	3.83E+05	2.17E-03	0.997	0.723

Clon No.	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	R ²	Rmax (nm)
B32	1.25E-09	3.01E+05	3.77E-04	0.994	0.874
B34	2.52E-09	2.41E+05	6.09E-04	0.995	0.782
B39	4.43E-09	3.04E+05	1.35E-03	0.995	1.060
B62	9.84E-10	3.79E+05	3.73E-04	0.995	1.400
B74	1.44E-09	3.23E+05	4.64E-04	0.995	1.080
C38	1.34E-09	3.14E+05	4.22E-04	0.995	0.935
C42	2.96E-08	1.10E+05	3.25E-03	0.998	0.652
C77	2.47E-09	3.14E+05	7.74E-04	0.996	0.959
M71	1.54E-09	3.51E+05	5.40E-04	0.995	0.916
M78	1.86E-09	3.30E+05	6.14E-04	0.995	0.920

Ejemplo 11 Análisis de la cinética de afinidad (Biacore) del anticuerpo

En este ejemplo, la afinidad de los anticuerpos obtenidos en la presente solicitud y el anticuerpo de control positivo 99961.1 a la proteína antígeno huROR1-His se detectó basándose en el dispositivo Biacore.

Acoplamiento de proteínas: La proteína huROR1-His producida en el Ejemplo 1.2 se diluyó a 5.6 µg/ml con solución reguladora NaAc, pH 5.0, el caudal se fijó en 10 µl/min, el tiempo de activación del chip se fijó en el valor predeterminado de 420 s con una mezcla de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), y la proteína antígeno huROR1-His se fijó a un nivel de aproximadamente 75 RU usando un modo de acoplamiento con una cantidad de acoplamiento preestablecida, y los grupos activados que no estaban unidos a la muestra de ensayo se bloquearon con etanolamina.

Condiciones de ensayo de la muestra: Se usó solución reguladora PBS (pH 7.4) con 0.05% de Tween-20 como solución reguladora de funcionamiento, y la solución reguladora de funcionamiento se usó como muestra de ensayo de control. Se estableció una serie de concentraciones de anticuerpos (4 nM, 20 nM). Durante el análisis de la muestra, la velocidad de flujo se fijó en 30 µl/min, el tiempo de unión fue de 120 s y el tiempo de disociación fue de 360 s. Una vez completada la disociación, se usó Gly-HCl 10 mM (pH 2.0) para la regeneración durante 20 s a fin de eliminar completamente el anticuerpo unido al ligando.

Ajuste de parámetros: El experimento se realizó en ciclos múltiples, tomando la señal de respuesta el tiempo de análisis como eje horizontal y el valor de respuesta como eje vertical. Tras la doble sustracción de referencia, los datos obtenidos se ajustaron mediante el software de análisis BIAcore T200. El modelo de ajuste adoptado fue el modelo de unión 1:1 de Langmuir, y se determinaron métricas de afinidad como la constante de disociación de unión.

Los resultados se muestran en la Tabla 5. El anticuerpo B62, con una KD de 6,39E-11, tiene una afinidad aproximadamente 2 órdenes de magnitud mejor que la del anticuerpo de control 99961.1, este último tiene una KD de 1,98E-9; además, la afinidad del anticuerpo B31 es comparable a la del anticuerpo de control 99961.1.

Tabla 5 Resultado de la prueba cinética de afinidad del anticuerpo obtenido en esta aplicación

Clon No.	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t 1/2 (s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi² (RU²)
99961.1	6.94E+05	1.37E-03	504.4	1.98E-09	Ajuste local	3.13
B31	6.53E+05	8.17E-04	848.8	1.25E-09	Ajuste local	1.61
B62	1.21E+06	7.74E-05	8954.3	6.39E-11	Ajuste local	0.92

Ejemplo 12 Agrupación de epítomos por cinética de afinidad

Los anticuerpos obtenidos en esta solicitud y el anticuerpo de control positivo 99961.1 se dividieron en varios grupos basándose en el epítomo de este ejemplo mediante el método de cinética de afinidad.

Los procedimientos experimentales detallados fueron los siguientes: En primer lugar, preparar la solución reguladora Q mezclando PBS (10 mM, pH 7.4) (sin IgG, adquirido a Jackson ImmunoResearch Lab) con 0.02% de Tween 20 (adquirido a Thermo) y 0,2% de BSA (adquirido a Source culture). Diluir la solución de almacenamiento de anticuerpos hasta una concentración final de 100 nM en la solución reguladora Q preparado. Del mismo modo, diluir la solución de almacenamiento del antígeno huROR1-His hasta una solución de trabajo de 50 nM en solución reguladora Q. A continuación, se llevó a cabo la detección y el análisis usando el instrumento Gator y el software que lo acompaña, empleando la configuración Tandem basada en el modo experimental Epitope Binning.

Los pasos específicos de detección y análisis fueron los siguientes:

Etapas de equilibrio 1: La sonda se equilibró en solución reguladora Q a 1000 rpm

durante 60 s;

Etapa de inmovilización del antígeno: Después de la etapa de equilibrio 1, la sonda se inmovilizó en solución reguladora Q que contenía 50 nM de antígeno a 400 rpm durante 90 s;

Etapa de equilibrio 2: Tras la etapa de inmovilización del antígeno, la sonda se equilibró en solución reguladora Q a 1000 rpm durante 60 s;

Etapa de unión al anticuerpo 1: Una vez completada la etapa de equilibrio 2, la sonda se sometió a reacción de unión en solución reguladora Q conteniendo 100 nM de anticuerpo 1 a 1000 rpm durante 180 s;

Etapa de equilibrio 3: Una vez finalizada la etapa de unión al anticuerpo 1, la sonda se equilibró en solución reguladora Q a 1000 rpm durante 30 s;

Etapa de unión al anticuerpo 2: Una vez completada la etapa de equilibrio 3, la sonda se sometió a reacción de unión en solución reguladora Q conteniendo 100 nM de anticuerpo 2 a 1000 rpm durante 180 s;

Fase de regeneración: Una vez finalizado un ensayo, *es decir*, desde la fase de equilibrio 1 hasta la fase de unión al anticuerpo 2, la sonda debe regenerarse en solución reguladora Q a 1000 rpm durante 50 s antes del siguiente ensayo.

Los resultados de la agrupación por epítomos de cada anticuerpo obtenido se muestran en la Tabla 6. Los resultados muestran que los anticuerpos de la presente solicitud y el anticuerpo de control 99961.1 se dividen en 2 grupos basados en epítomos, en los que solo C42 y el anticuerpo de control comparten el mismo epítipo de unión, y los anticuerpos restantes tienen epítomos diferentes del anticuerpo de control.

Tabla 6 Resumen de los resultados de la agrupación de epítomos

Agrupación de epítomos	Clon No.
1	99961.1, C42
2	B62, B32, C38, B74, M71, B34, M78, C77, B39, B31

Ejemplo 13 Humanización de un anticuerpo murino

Las secuencias VH y VL de los anticuerpos murinos B31 y B62 examinados en el Ejemplo 4 se compararon por separado con bases de datos de anticuerpos humanos conocidos para encontrar las secuencias VH y VL de genes de la línea germinal humana con la mayor homología con las secuencias VH y VL de ratón, respectivamente. Se

determinaron las regiones marco de las correspondientes secuencias VH y VL de genes de la línea germinal humana (las regiones CDR y marco se definieron usando AbM), y las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de los genes de la línea germinal se sustituyeron por las correspondientes secuencias CDR en los anticuerpos murinos B31 y B62 de la presente solicitud. A continuación, con la ayuda de una simulación de predicción por ordenador, los aminoácidos murinos de las regiones marco de los anticuerpos murinos B31 y B62 que tienen un efecto importante en la unión al antígeno se conservaron mediante retro-mutación. En la Tabla 7 se muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR de los anticuerpos humanizados resultantes de la humanización de los anticuerpos murinos B31 y B62. Se construyeron, expresaron y purificaron diversos anticuerpos resultantes de la humanización de B31 y B62 por el método del Ejemplo 5, y las diversas proteínas de anticuerpo resultantes de la humanización de B31 y B62 se identificaron por SDS-PAGE y SEC-HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los resultados muestran que cada anticuerpo presenta bandas de alrededor de 150 kD en gel no reductor, y bandas de alrededor de 55 kD y 25 kD en gel reductor, que son coherentes con el tamaño esperado. La pureza de todos los anticuerpos obtenidos en esta aplicación es superior al 95% por detección en gel reductor; la pureza monomérica SEC de todos los anticuerpos es superior al 96%.

Tabla 7 Secuencias de aminoácidos de las regiones CDR del anticuerpo humanizado

Clon No.	SEQ ID NO	Secuencia	
B31-H1L1, B31-H2L2, B31-H2L3, B31-H3L2, B31-H3L3, B31-H3L4, B31-H4L2, B31-H4L3, B31-H4L4	4	HCDR1	GFTFSRYAMS
B31-H1L1, B31-H2L2, B31-H2L3, B31-H3L2, B31-H3L3, B31-H3L4,	5	HCDR2	SISRGGSTY
B31-H4L2, B31-H4L3, B31-H4L4	42	HCDR2	AISRGGSTY
B31-H1L1, B31-H2L2, B31-H2L3, B31-H3L2, B31-H3L3, B31-H3L4, B31-H4L2, B31-H4L3, B31-H4L4	6	HCDR3	YFGNYDAMD Y
B31-H1L1, B31-H2L2, B31-H3L2, B31-H4L2	31	LCDR1	KASQDINNYV S
B31-H2L3, B31-H3L3, B31-H4L3	43	LCDR1	RASQDINNYV S
B31-H3L4, B31-H4L4	44	LCDR1	RASQDINNYL S
B31-H1L1, B31-H2L2, B31-H3L2, B31-H4L2	45	LCDR2	RANRLVD
B31-H2L3, B31-H3L3, B31-H4L3	46	LCDR2	RANRLVS
B31-H3L4, B31-H4L4	47	LCDR2	RANRLQS
B31-H1L1, B31-H2L2, B31-H2L3, B31-H3L2, B31-H3L3, B31-H3L4, B31-H4L2, B31-H4L3, B31-H4L4	48	LCDR3	LQFDEFPTYT
B62-H1L1, B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H2L4, B62-H3L2, B62-H3L3, B62-H3L4	1	HCDR1	GFTFSSYVM S
B62-H1L1, B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H2L4, B62-H3L2, B62-H3L3, B62-H3L4	2	HCDR2	TINSNGGNTY
B62-H1L1, B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H2L4, B62-H3L2, B62-H3L3,	3	HCDR3	DSLGLRRRD YAMDY

B62-H3L4			
B62-H1L1, B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H3L2, B62-H3L3	28	LCDR1	VTSIDIDDDV N
B62-H2L4, B62-H3L4	49	LCDR1	QTSIDIDDDV N
B62-H1L1, B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H3L2, B62-H3L3	29	LCDR2	AGNTLRP
B62-H2L4, B62-H3L4	50	LCDR2	AGNTLET
B62-H1L1, B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H2L4, B62-H3L2, B62-H3L3, B62-H3L4	30	LCDR3	LQSDNLPYT

Tabla 8 Propiedades fisicoquímicas del anticuerpo humanizado

Clon No.	SDS-PAGE(%)	SEC(%)
B31	>95.0	100
B31-H1L1	>95.0	98.34
B31-H2L2	>95.0	100
B31-H2L3	>95.0	100
B31-H3L2	>95.0	100
B31-H3L3	>95.0	100
B31-H3L4	>95.0	100
B31-H4L2	>95.0	100
B31-H4L3	>95.0	99.1
B31-H4L4	>95.0	100
B62	>95.0	98.72
B62-H1L1	>95.0	100
B62-H1L2	>95.0	100
B62-H2L2	>95.0	100
B62-H2L3	>95.0	100
B62-H2L4	>95.0	96.73
B62-H3L2	>95.0	100
B62-H3L3	>95.0	100
B62-H3L4	>95.0	97.07

Ejemplo 14 Evaluación de la afinidad antigénica del anticuerpo humanizado

En este ejemplo, la afinidad del anticuerpo humanizado con la proteína antígeno ROR1 humana huROR1-His se detectó basándose en el método ELISA, y la afinidad del anticuerpo humanizado con las células tumorales A549 también se detectó basándose en el ensayo FACS. El método de ensayo específico se refirió al Ejemplo 7.

Los resultados del ELISA se muestran en las Figuras 10A-10E. Los anticuerpos humanizados tienen afinidad por la proteína antígeno comparable a la de la correspondiente molécula madre y a la del anticuerpo de control 99961.1.

Los resultados FACS se muestran en las Figuras 11A-11B. Excepto B31-H3L4, B31-H4L3, B31-H4L2 y B31-H4L4, los demás anticuerpos humanizados tienen afinidad por la proteína antígeno de las células tumorales A549 comparable a la de la correspondiente molécula madre y a la del anticuerpo de control 9996.1.

Ejemplo 15 Evaluación de la tasa de internalización del anticuerpo humanizado

En este ejemplo, los anticuerpos humanizados B31-H3L3 y B62-H3L3 del Ejemplo 13 se sometieron a detección de internalización basada en Fab-Zap. El método específico se remitió al Ejemplo 9. Los resultados se muestran en la Figura 12. La tasa de internalización de B31-H3L3 y B62-H3L3 es comparable a la del anticuerpo de control 99961.1.

Ejemplo 16 Preparación del ADC

En este ejemplo, los anticuerpos B62-H3L3, B31-H3L3 y el anticuerpo de control 99961.1 se conjugaron con la toxina MMAE (un inhibidor de la tubulina con actividad anticancerígena) para construir conjugados anticuerpo-fármaco. MMAE se conectó al enlazador MC-VC-PAB para formar MC-VC-PAB-MMAE, y el enlazador se unió covalentemente al grupo sulfhidrilo de la cisteína del anticuerpo, conjugando así el anticuerpo con MMAE para obtener un conjugado anticuerpo-fármaco. Los anticuerpos IgG1 tienen 16 pares de residuos de cisteína, que están presentes en forma de 12 enlaces disulfuro intracadena y 4 entre cadenas. Los enlaces disulfuro entre cadenas son accesibles mediante disolventes y pueden reducirse con agentes reductores para formar ocho grupos sulfhidrilo, que se convierten en objetivos de conjugación (McCombs J, Owen S. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. AAPS J. 2015;17:339-51).

El método de preparación específico fue el siguiente:

Los anticuerpos B62-H3L3, B31-H3L3 y el anticuerpo de control 99961.1 se sacaron de la nevera a -80°C , se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de ultrafiltración de 30KD de 15 ml por separado, y se añadió solución reguladora de acoplamiento (componentes por 1 L: $\text{Na HPO}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6.86 g, $\text{NaH}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.58 g, agua purificada hasta un total de 1000 g, pH 7.4) hasta un total de 15 ml. A continuación, las disoluciones se centrifugaron a 4500 rpm durante unos 30 min, se concentraron a 2-3 ml y se rellenaron con dializado (componentes por 1 L: histidina 0.73 g, clorhidrato de histidina monohidratado 1.12 g, agua purificada hasta un total de 1000 g, pH 6.0) hasta un volumen final de 15 ml. La diálisis se repitió 8-10 veces para obtener la solución madre de anticuerpo, y la concentración de anticuerpo se midió después de la diálisis.

El grupo tiol de la cisteína del anticuerpo se redujo mediante un sistema de reacción de reducción, que se formó añadiendo la solución madre del anticuerpo, 10 mM de solución madre del agente reductor del enlace disulfuro TCEP (solución madre de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina, componentes por 1 L: $\text{Na HPO}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6.86 g, $\text{NaH}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.58 g, agua purificada hasta un total de 1000 g), solución madre de DTPA 10 mM (solución madre de ácido dietilentriaminopentaacético, contenidos por 1 L: DTPA 3.90 g, NaOH 1.20 g, agua purificada hasta un total de 1000 g) y solución reguladora de acoplamiento en orden. La cantidad de cada componente añadida al sistema de reacción de reducción se muestra en la Tabla 9, de modo que la concentración de anticuerpo en el sistema de reacción de reducción es de 5 mg/ml, la concentración final de DTPA es de 1 mM, la relación molar de TCEP a B62-H3L3 o B31-H3L3 es de 2, y la relación molar de TCEP a 9996.1 es de 2,2. Después de mezclar a fondo, el sistema de reacción de reducción se mezcla con TCEP. Después de mezclar bien, el sistema de reacción de reducción se colocó en un agitador a temperatura constante de 25°C , con una velocidad de rotación de 400 rpm, durante 2 h de reacción de reducción.

MC-VC-PAB-MMAE se pesó y disolvió en DMSO para preparar una solución madre de MC-VC-PAB-MMAE 5 mM. Una vez completada la reacción de reducción, se añadió la solución madre de MC-VC-PAB-MMAE al sistema de reacción de reducción en un baño de agua helada por orden, y la cantidad añadida fue la indicada en la Tabla 10, para preparar un sistema de reacción de acoplamiento. Después de mezclar a fondo, el sistema de reacción de acoplamiento se colocó en un agitador a temperatura constante de 25°C a 400 rpm y se acopló durante 1 h, para obtener una solución que contenía ADC.

Una vez completada la reacción de acoplamiento, la solución que contenía ADC se

centrifugó y filtró para obtener la muestra de ADC, que se transfirió a un tubo de centrifuga de ultrafiltración 30KD de 15 ml. Se añadió dializado a 15 ml, se centrifugó a 4500 rpm durante 20 min para concentrar a 2-3 ml, y después se volvió a reponer dializado a 15 ml. La diálisis se repitió 8-10 veces. Las muestras de ADC después de la diálisis se sometieron a detección SEC-HPLC, detección HIC-HPLC, detección de concentración, detección de fármaco libre, etc. Los resultados se muestran en la Tabla 11. Los resultados muestran que se obtuvieron ADCs con una pureza superior al 99%.

Tabla 9 Componentes del sistema de reacción de reducción

Clon No.	Concentración de la solución madre de anticuerpos (mg/ml)	Volumen de solución madre de anticuerpo o añadida (ml)	Cantidad de anticuerpos (mg)	Volumen de 10mM Solución madre de TCEP añadida (μl)	Volumen de solución madre de DTPA 10mM añadida (μl)	Volumen de solución reguladora de acoplamiento o añadido (μl)
B62-H3L3	7.14	10.5	74.97	103.4	1499	2892
B31-H3L3	9.28	5.0	46.4	64	928	3288
99961.1	8.62	9.0	77.58	117.7	1552	4846

Tabla 10 Cantidad de solución madre de MC-VC-PAB-MMAE añadida

Clon No.	B62-H3L3	B31-H3L3	99961.1
Relación molar MC-VC-PAB-MMAE/anticuerpo	6.0	6.0	6.0
Volumen de solución madre de MC-VC-PAB-MMAE 5mM añadida (μl)	620	384	642

Tabla 11 Rutinas de las muestras de ADC

Clon No.	SEC-	Con	Residuo de	HIC-HPLC
----------	------	-----	------------	----------

	HPLC	centración (mg/ml)	fármaco libre	DAR medio	D0%	D2%	D4%	D6%	D8%
B62-H3L3-MMAE	99.9%	9.9	no detectado	3.5	6.40	34.11	41.47	13.76	4.26
B31-H3L3-MMAE	99.6%	6.5	no detectado	3.5	6.50	34.45	41.49	13.88	3.67
99961.1-MMAE	99.8%	7.1	0.03%	3.8	4.61	30.76	42.30	16.36	5.97

Ejemplo 17 Evaluación de la actividad de unión al antígeno de la ADC

En este ejemplo, la capacidad de los ADCs preparados (B62-H3L3-MMAE y B31-H3L3-MMAE) de unirse a ROR1 humano en células tumorales A549 y HT-29 (células de cáncer de colon humano) se detectó basándose en el ensayo FACS.

El método específico fue el siguiente: Se prepararon células A549 o células HT-29 en fase de crecimiento logarítmico hasta obtener una suspensión unicelular, se ajustó la densidad a 1×10^6 células/ml, se añadieron 100 μ l/pocillo a una placa de fondo redondo de 96 pocillos y, a continuación, se centrifugaron a 4 °C, 300 g, y se eliminó el sobrenadante. Las soluciones de dilución en gradiente (1.0000, 0.3333, 0.1111, 0.0370, 0.0123, 0.0041, 0.0014, 0.0001 μ g/ml) de los anticuerpos de la presente solicitud (B62-H3L3 y B31-H3L3), ADC de la presente solicitud (B62-H3L3-MMAE y B31-H3L3-MMAE), 99961.1, 99961.1-MMAE y el control negativo se añadieron a los pocillos correspondientes, respectivamente, se mezclaron bien y se incubaron a 4°C durante 30 min. Tras la incubación, la mezcla celular se lavó tres veces y, a continuación, se añadieron 100 μ l de anticuerpo secundario F(ab')₂ Anti-Human IgG-Fc de cabra diluido al 1:300 (abcam, ab98596). La mezcla se incubó a 4 °C en la oscuridad durante 30 min. Tras tres lavados, las células se detectaron mediante citometría de flujo (Beckman, CytoFLEX AOO-1-1102).

Los resultados se muestran en las Figuras 13A-13B: Los resultados de la unión a células A549 se muestran en la Figura 13A. Tras el acoplamiento, las actividades de unión de B62-H3L3-MMAE y 99961.1-MMAE a células A549 son ligeramente inferiores a las de

los anticuerpos desnudos correspondientes, y las actividades de unión de B62-H3L3 y B62-H3L3-MMAE a células A549 son superiores a las de los controles positivos correspondientes; Los resultados de unión a células HT-29 se muestran en la Figura 13B. Las actividades de los anticuerpos desnudos que se unen a las células HT-29 son equivalentes a las de los ADC correspondientes, y las actividades de B62-H3L3 y B62-H3L3-MMAE que se unen a las células HT-29 son ligeramente superiores a las de los controles positivos correspondientes.

Ejemplo 18. Evaluación del efecto de destrucción de células tumorales del ADC basado en el ensayo MTS

En este ejemplo, se usaron células A549 y HT-29 para detectar el efecto letal de los ADC de la presente solicitud y el ADC de control.

El método específico fue el siguiente: Se prepararon células A549 o células HT-29 en fase de crecimiento logarítmico hasta obtener una suspensión unicelular, la densidad de A549 se ajustó a 1×10^4 células/ml, y la densidad de HT-29 se ajustó a $1,5 \times 10^4$ células/ml, y se añadieron 100 µl/pocillo a una placa de cultivo celular de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C, 5% CO₂ durante 12 horas. A continuación, se añadieron muestras de ADC diluidas en gradiente (2000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,813, 1,953 nM) y se cultivaron a 37°C, 5% CO₂ durante 72 h (células A549) o 96 h (células HT-29). A continuación, se añadieron 40 µl de MTS (Promega, G3580) a cada pocillo, se incubaron a 37°C durante 1 h y se leyeron los datos en OD492 usando un lector de microplacas.

Los resultados se muestran en las Figuras 14A-14D: el efecto letal de B31-H3L3-MMAE sobre dos células tumorales A549 (Figura 14A) y HT-29 (Figura 14C) es ligeramente superior al del control 99961.1-MMAE, mientras que el efecto letal de B62-H3L3-MMAE sobre A549 (Figura 14B) y HT-29 (Figura 14D) es ligeramente inferior al del control 99961.1-MMAE.

Ejemplo 19 Evaluación del efecto de destrucción de células tumorales del ADC basado en el ensayo CCK8

En el ejemplo, se utilizaron células Jeko-1 (células humanas de linfoma de células del manto), células MDA-MB-468 (células humanas de cáncer de mama) y células NCI-H1944 (células humanas de cáncer de pulmón) para detectar el efecto letal de B31-H3L3-MMAE, B62-H3L3-MMAE y ADC de control.

El método específico fue el siguiente: Se prepararon células Jeko-1, células MDA-

MB-468 o células NCI-H1944 en fase de crecimiento logarítmico hasta obtener una suspensión unicelular, la densidad de Jeko-1 se ajustó a 1×10^5 células/ml, la densidad de MDA-MB-468 se ajustó a 2×10^5 células/ml y la densidad de NCI-H1944 se ajustó a 12×10^5 células/ml, y se añadió 90 µl/pocillo de suspensión unicelular a una placa de cultivo celular de 96 pocillos y se cultivó a 37°C, 5% CO₂ durante 12 horas. A continuación, se añadieron las muestras de ADC diluidas gradualmente (500, 158, 50, 15.8, 5, 1.58, 0.5, 0.158 y 0.05 nM). Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 h. A continuación, se añadieron 10 µl de CCK8 (Bimake, B34304) a cada pocillo, se incubaron a 37°C durante 1 h y se leyeron los datos en OD450 usando un lector de microplacas.

Los resultados experimentales se muestran en las Figuras 15A-15C. Los efectos letales de B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE sobre tres células tumorales, Jeko-1 (Figura 15A), MDA-MB-468 (Figura 15B) y NCI-H1944 (Figura 15C), son comparables a los del control 99961.1-MMAE, en donde la EC₅₀ de B31-H3L3-MMAE en Jeko-1, MDA-MB-468 y NCI-H1944 es de 38,24 nM, 15,24 nM y 117,3 nM, respectivamente, y la EC₅₀ de B62-H3L3-MMAE en Jeko-1, MDA-MB-468 y NCI-H1944 es de 50.14 nM, 28.64 nM y 128.6 nM, respectivamente.

Ejemplo 20 Evaluación del efecto letal dependiente del antígeno del ADC basado en el ensayo CCK8

En este ejemplo, se utilizaron células huROR1-HEK293 para detectar el efecto letal dependiente de antígeno de B31-H3L3-MMAE y ADC de control.

El método específico fue el siguiente: se prepararon células huROR1-HEK293 en fase de crecimiento logarítmico hasta obtener una suspensión unicelular, se ajustó la densidad celular a 6×10^4 células/ml y se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión unicelular a una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Después de cultivar a 37°C, 5% CO₂ durante 24 h, se añadieron 50 µl de 100 µg/ml del anticuerpo B31-H3L3 o del anticuerpo de control positivo 99961.1 a cada pocillo. Después de incubar a 37°C durante 2 h, se añadió correspondientemente la solución de dilución en gradiente (42.6667, 21.3333, 10.6667, 5.3333) del ADC B31-H3L3-MMAE o del ADC de control 99961.1-MMAE. Después de cultivar a 37°C, 5% CO₂ durante 96 h, se añadieron 30 µl de CCK8 (absin/Aibixin, abs50003) a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 1-4h. A continuación, se leyó la placa en OD450 usando un lector de microplacas. El sistema que sólo añadía ADC, pero no anticuerpo, se usó como grupo de control.

Los resultados se muestran en la Figura 16. El efecto letal del ADC sobre las células

huROR1-HEK293 puede inhibirse significativamente de forma competitiva por el anticuerpo correspondiente, B31-H3L3 y 99961.1, lo que demuestra que el efecto letal celular del ADC preparado en la presente solicitud depende de la unión del anticuerpo conectado al ADC con el antígeno de la superficie celular y, por tanto, es un efecto letal dependiente del antígeno en lugar de un efecto letal inespecífico por la toxina conectada.

Ejemplo 21 Evaluación de la eficacia de internalización del ADC

En este ejemplo, se utilizaron células tumorales A549 y HT-29 para detectar la eficacia de internalización del ADC obtenido en esta solicitud basándose en el ensayo FACS. Para los métodos experimentales detallados, véase el Ejemplo 9.

Los resultados experimentales muestran que en células A549 (Figura 17A), la tasa de internalización de B31-H3L3-MMAE es comparable a la del ADC de control 99961.1-MMA, la tasa de internalización de B62-H3L3-MMAE es ligeramente inferior a la del ADC de control positivo, y las eficiencias de internalización de los ADCs son todas superiores a las de los anticuerpos correspondientes. En células HT-29 (Figura 17B), la tasa de internalización de B31-H3L3-MMAE es ligeramente superior a la del ADC de control positivo, la tasa de internalización de B62-H3L3-MMAE es ligeramente inferior a la del ADC de control positivo, y las eficiencias de internalización de los anticuerpos son en general inferiores a las de los ADC correspondientes.

Ejemplo 22 Evaluación de la eficacia inhibidora del ADC en un modelo de ratón portador de un tumor HT-29

En este ejemplo, se verificaron los efectos antitumorales de dos ADC candidatos (B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE) en animales, se usó 99961.1-MMAE como control positivo y las células tumorales utilizadas fueron células de cáncer de colon HT-29 (BNCC337732).

El método específico fue el siguiente: Se utilizaron ratones desnudos Balb/C hembra de 6-8 semanas de edad y unos 20 g de peso (Beijing Weitong Lihua Laboratory Animal Technology Co., Ltd.), y se inyectaron 1×10^6 células HT-29 por vía subcutánea unilateral en cada ratón desnudo. Cuando el volumen del tumor alcanzó unos 100 mm^3 , los ratones se agruparon aleatoriamente en jaulas. En total se dividieron 9 grupos, 6 ratones desnudos portadores de tumores en cada grupo, incluyendo un grupo de control negativo PBS, 5 grupos de ADC candidatos (B31-H3L3-MMAE 0.4 mg/kg (mpk), B31-H3L3-MMAE 2 mg/kg, B31-H3L3-MMAE 10 mg/kg, B62-H3L3-MMAE 2 mg/kg y B62-H3L3-MMAE 10 mg/kg) y 3 grupos de ADC de control positivo (99961.1-MMAE 0.4 mg/kg, 99961.1-MMAE 2 mg/kg y

99961.1-MMAE 10 mg/kg). Los fármacos se administraron por inyección en la vena caudal, dos veces por semana, y el volumen tumoral se midió dos veces, para un total de 8 administraciones/4 semanas (BIW*4). El volumen tumoral (V) se calculó de la siguiente manera: $V = L \times W^2 / 2$ (donde L es el diámetro tumoral más largo y W es el diámetro tumoral más corto). Una semana después de finalizar la administración, se practicó la eutanasia a los ratones, se extirparon los tumores y se midió el peso tumoral. Se analizaron los datos del volumen tumoral, el peso tumoral y el cambio de peso corporal de los ratones y se calculó la inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados se muestran en las Figuras 18A-18C y en la Tabla 12.

Los resultados experimentales muestran que no hay diferencias significativas en el peso corporal de los ratones de cada grupo, y no hay cambios significativos en el peso corporal de los ratones de cada grupo durante el tratamiento, lo que indica que los ratones tienen buena tolerancia a los ADC (Figura 18B); B31-H3L3-MMAE, B62-H3L3-MMAE y el ADC de control 99961.1-MMAE muestran efectos significativos de inhibición tumoral en condiciones de dosis altas (10 mpk). En condiciones de dosis altas, B31-H3L3-MMAE muestra un efecto de inhibición tumoral equivalente al de 99961.1-MMAE, y B62-H3L3-MMAE muestra una inhibición del crecimiento tumoral ligeramente más débil que la del ADC de control 99961.1-MMAE. En condiciones de dosis más bajas (2 mpk), la inhibición del crecimiento tumoral de B62-H3L3-MMAE es significativamente mejor que la del ADC de control 99961.1-MMAE y que la de B62-H3L3-MMAE (Figura 18A, Figura 18C y Tabla 12).

Tabla 12 Inhibición del crecimiento tumoral de ADC en ratones

	Inhibición del crecimiento tumoral (TGI (%)) = (1-volumen tumoral medio del grupo experimental/volumen tumoral medio del grupo de control PBS) × 100%.								
	Día de medición								
	23	27	30	34	37	41	44	48	51
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99961.1-MMAE 10 mpk	-15.19	37.35	44.00	69.99	82.23	85.78	90.30	88.83	89.35
99961.1-MMAE 2 mpk	-5.80	-10.51	-9.85	1.17	14.41	5.62	13.72	17.82	15.90
99961.1-MMAE	7.60	0.08	4.71	-2.64	9.28	2.61	7.32	8.34	11.08

0.4 mpk									
B31-H3L3-MMAE 10 mpk	-5.56	17.16	36.56	59.72	73.42	83.01	85.35	85.16	85.53
B31-H3L3-MMAE 2 mpk	-7.50	8.48	6.86	0.99	4.88	6.70	9.97	14.09	15.37
B31-H3L3-MMAE 0.4 mpk	-2.50	8.22	-0.94	-5.59	4.75	9.43	12.34	17.92	16.05
B62-H3L3-MMAE 10 mpk	20.27	29.04	23.90	48.45	63.35	67.65	68.50	73.86	73.87
B62-H3L3-MMAE 2 mpk	-1.05	1.92	-2.38	4.20	17.04	16.26	23.06	27.19	33.54

Ejemplo 23 Evaluación de la eficacia inhibidora del ADC en un modelo de ratón portador del tumor A549

En este ejemplo, se detectaron los efectos antitumorales de dos ADC candidatos (B31-H3L3-MMAE y B62-H3L3-MMAE) en animales. Las células tumorales utilizadas fueron células de cáncer de pulmón no microcítico A549 (Shanghai Cell Bank, Chinese Academy of Sciences, C2107019), y se usó 99961.1-MMAE como control positivo.

El método específico fue el siguiente: Se utilizaron ratones desnudos hembra de 6-8 semanas de edad y un peso aproximado de 18-20 g (Balb/C, Beijing Weitong Lihua Laboratory Animal Technology Co., Ltd.), y se inyectaron 1×10^6 células A549 por vía subcutánea unilateral en la cara dorsal derecha de cada ratón desnudo. Cuando el volumen del tumor alcanzó unos 100 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en jaulas. Se dividieron en total 4 grupos, 6 ratones desnudos portadores de tumores en cada grupo, incluyendo un grupo de control negativo PBS, 2 grupos ADC (B31-H3L3-MMAE 10 mpk (mg/kg) y B62-H3L3-MMAE 10 mpk) y 1 grupo ADC de control positivo (99961.1-MMAE 10 mpk). Los fármacos se administraron por inyección en la vena caudal, dos veces por semana, y el volumen tumoral se midió dos veces, para un total de 6 administraciones/3 semanas (BIW*3). El volumen tumoral (V) se calculó de la siguiente manera: $V = L \times W^2 / 2$ (donde L es el diámetro tumoral más largo y W es el diámetro tumoral más corto). Tras un cierto periodo de observación después de finalizar la administración del fármaco, se practicó la eutanasia a los ratones, se extirparon los tumores y se midió el peso tumoral. Se analizaron los datos del volumen tumoral, el peso tumoral y el cambio de peso corporal de los ratones, y se calculó la inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados se muestran

en las Figuras 19A-19C y en la Tabla 13.

Los resultados experimentales muestran que no hay cambios significativos en el peso corporal de los ratones de cada grupo durante el tratamiento, lo que indica que los ratones tienen buena tolerancia a los ADC (Figura 19B); B62-H3L3-MMAE muestra un efecto antitumoral comparable al del ADC de control positivo a la misma dosis, y B31-H3L3-MMAE muestra un efecto antitumoral superior al del ADC de control positivo (Figuras 19A, 19C y Tabla 13).

Tabla 13 Inhibición del crecimiento tumoral de ADC en ratones

	Inhibición del crecimiento tumoral (TGI (%)) = $(1 - \text{volumen tumoral medio del grupo experimental} / \text{volumen tumoral medio del grupo de control PBS}) \times 100\%$.			
Día de medición	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk	B31-H3L3-MMAE 10 mpk	B62-H3L3-MMAE 10 mpk
27	0	13.93	8.75	18.82
31	0	24.23	32.35	33.29
34	0	25.74	40.25	30.91
38	0	32.76	49.82	40.03
41	0	43.24	51.16	37.77
45	0	40.56	47.39	35.15
48	0	37.81	43.98	36.38

Ejemplo 24 Evaluación de la eficacia inhibidora del ADC en un modelo de ratón portador del tumor NCI-N87

En este ejemplo, se detectó el efecto antitumoral de un ADC candidato (B31-H3L3-MMAE) en animales. Las células tumorales utilizadas fueron células de cáncer gástrico NCI-N87 (Banco de Células de Shanghai de la Academia China de Ciencias, C2009021, P3), y se usó 99961.1-MMAE como control positivo.

El método específico fue el siguiente: Se utilizaron ratones desnudos hembra de 6-8 semanas de edad y un peso aproximado de 18-20 g (Balb/C, Beijing Weitong Lihua Laboratory Animal Technology Co., Ltd.), y se inyectaron 1×10^6 células NCI-N87 por vía subcutánea en la cara dorsal de cada ratón desnudo. Cuando el volumen del tumor alcanzó unos 100 mm^3 , los ratones se agruparon aleatoriamente en jaulas. Se dividieron en total 5 grupos, 10 ratones desnudos portadores de tumores en cada grupo, incluyendo un grupo

de control negativo PBS, 2 grupos ADC (B31-H3L3-MMAE 5 mpk (mg/kg) y B31-H3L3-MMAE 10 mpk) y 2 grupos ADC de control positivo (99961.1-MMAE 5 mpk y 99961.1-MMAE 10 mpk). Los fármacos se administraron mediante inyección en la vena caudal, una vez a la semana, y el volumen tumoral se midió dos veces, para un total de 3 administraciones/3 semanas (BIW*3). El volumen tumoral (V) se calculó de la siguiente manera: $V = L \times W^2 / 2$ (donde L es el diámetro tumoral más largo y W es el diámetro tumoral más corto). Se analizaron los datos del volumen tumoral y el cambio de peso corporal del ratón, y se calculó la inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados se muestran en las Figuras 20A-20B y en la Tabla 14.

Los resultados experimentales muestran que no hay cambios significativos en el peso corporal de los ratones de cada grupo durante el tratamiento, lo que indica que los ratones tienen buena tolerancia al ADC (Figura 20B); en comparación con el grupo PBS, cada grupo de dosis tiene un efecto significativo de inhibición tumoral, y la molécula B31-H3L3-MMAE a 10 mpk tiene un efecto de inhibición tumoral comparable al de la molécula 99961.1-MMAE (Figura 20A y Tabla 14).

Tabla 14 Inhibición del crecimiento tumoral de ADC en ratones

	Inhibición del crecimiento tumoral (TGI (%)) = (1-volumen tumoral medio del grupo experimental/volumen tumoral medio del grupo de control PBS) × 100%.				
Día de medición	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk	99961.1-MMAE 5 mpk	B31-H3L3-MMAE 10 mpk	B31-H3L3-MMAE 5 mpk
9	0	8.56	11.62	9.34	-1.37
13	0	70.46	60.38	70.29	50.63
16	0	85.05	76.07	85.24	66.26
20	0	93.11	86.75	93.39	78.22
23	0	96.15	91.1	96.64	83.03
27	0	97.36	94.75	98.1	90.91
30	0	98.27	95.93	98.59	91.62
34	0	98.61	97.67	98.9	94.93
37	0	98.87	97.75	99.04	93.89
41	0	99.28	98.28	99.11	95.15

44	0	99.40	98.2	99.31	94.2
48	0	99.40	98.09	99.48	94.68
51	0	99.20	97.86	99.31	91.52

Ejemplo 25 Evaluación de la eficacia inhibidora del ADC en un modelo de ratón portador de un tumor MDA-MB-231

En este ejemplo, se detectó el efecto antitumoral de un ADC candidato (B31-H3L3-MMAE) en animales. Las células tumorales utilizadas fueron células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 (Shanghai Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences, C2006040), y se usó 99961.1-MMAE como control positivo.

El método específico fue el siguiente: Se utilizaron ratones desnudos hembra de 6-8 semanas de edad y un peso aproximado de 20-22 g (NSG, Beijing Weitong Lihua Laboratory Animal Technology Co., Ltd.), y se inyectaron 1×10^6 células MDA-MB-231 por vía subcutánea en la cara dorsal de cada ratón desnudo. Cuando el volumen del tumor alcanzó unos 100 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en jaulas. En total se dividieron 5 grupos, 10 ratones desnudos portadores de tumores en cada grupo, incluyendo un grupo de control negativo PBS, 2 grupos ADC (B31-H3L3-MMAE 5 mpk (mg/kg) y B31-H3L3-MMAE 10 mpk) y 2 grupos ADC de control positivo (99961.1-MMAE 5 mpk y 99961.1-MMAE 10 mpk). Los fármacos se administraron mediante inyección en la vena caudal, una vez a la semana, y el volumen tumoral se midió dos veces, para un total de 3 administraciones/3 semanas (BIW*3). El volumen tumoral (V) se calculó de la siguiente manera: $V = L \times W^2 / 2$ (donde L es el diámetro tumoral más largo y W es el diámetro tumoral más corto). Se analizaron los datos del volumen tumoral y el cambio de peso corporal del ratón, y se calculó la inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados se muestran en las Figuras 21A-21B y en la Tabla 15.

Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas en la fase inicial de la administración del fármaco entre los ratones de cada grupo. El grupo PBS empezó a mostrar pérdida de peso corporal en el día 35, lo que se esperaba que se debiera a la sobrecarga tumoral. No hay cambios significativos en el peso corporal de los ratones del grupo ADC y del grupo de control positivo, lo que indica que los ratones tienen una buena tolerancia a los ADC (Figura 21B). En comparación con el grupo PBS, el control positivo y los grupos de dosis altas de ADC de prueba tienen un efecto antitumoral considerable, mostrando un efecto significativo. En condiciones de dosis bajas, el ADC de prueba (B31-H3L3-MMAE) muestra un efecto antitumoral superior al del ADC de control positivo. Los

grupos de dosis bajas muestran un cierto rebote del tejido tumoral tras la retirada del fármaco (Figura 21A y Tabla 15).

Tabla 15 Inhibición del crecimiento tumoral de ADC en ratones

	Inhibición del crecimiento tumoral (TGI (%)) = (1-volumen tumoral medio del grupo experimental/volumen tumoral medio del grupo de control PBS) × 100%.				
Día de medición	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk	99961.1-MMAE 5 mpk	B31-H3L3-MMAE 10 mpk	B31-H3L3-MMAE 5 mpk
21	0	27.12	25.14	29.51	24.01
25	0	59.78	41.55	59.33	50.35
28	0	76.74	61.45	74.57	67.87
32	0	87.51	73.37	87.43	79.37
35	0	91.65	79.35	91.32	85.76
39	0	94.82	84.93	94.55	89.98
42	0	95.56	85.01	95.56	90.53
46	0	96.13	79.9	95.87	88.81
49	0	96.25	76.4	96.03	86.62
53	0	91.58	31.55	91.85	58.88
56	0	96.60	67.66	96.60	79.79

Ejemplo 26 Evaluación de la eficacia inhibidora del ADC en un modelo de ratón portador de un tumor MDA-MB-468

En este ejemplo, se detectó el efecto antitumoral de un ADC candidato (B31-H3L3-MMAE) en animales. Las células tumorales utilizadas fueron células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468 (Shanghai Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences, TCHu136), y se usó 99961.1-MMAE como control positivo.

El método específico fue el siguiente: Se utilizaron ratones desnudos hembra de 6-8 semanas de edad y un peso aproximado de 21-25 g (NOD SCID, Zhejiang Weitong Lihua Laboratory Animal Technology Co., Ltd.), y se inyectaron 1×10^7 células MDA-MB-468 por vía subcutánea en la cara dorsal de cada ratón desnudo. Cuando el volumen del tumor alcanzó unos 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en jaulas. Se dividieron 5 grupos, 6 ratones desnudos portadores de tumores en cada grupo, incluyendo un grupo de

control negativo PBS, 2 grupos ADC (B31-H3L3-MMAE 5 mpk (mg/kg) (QW*3), B31-H3L3-MMAE 10 mpk (QW*3) y 2 grupos ADC de control positivo (99961.1-MMAE 5 mpk (QW*3), 99961.1-MMAE 10 mpk (QW*3); en total 2 grupos con 3 ratones nude portadores de tumores en cada grupo, incluyendo B31-H3L3-MMAE 10 mpk (dosis única) y 99961.1-MMAE 10 mpk (dosis única), y el método de administración fue la inyección en la vena de la cola, para un total de 3 administraciones/3 semanas (QW*3) o dosis única. El volumen tumoral (V) se calculó de la siguiente manera: $V = L \times W^2 / 2$ (donde L es el diámetro tumoral más largo y W es el diámetro tumoral más corto). Se analizaron los datos del volumen tumoral y el cambio de peso corporal del ratón, y se calculó la inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados se muestran en las Figuras 22A-22B y en las Tablas 16-17.

Los resultados experimentales muestran que no hay cambios significativos en el peso corporal de los ratones de cada grupo durante el periodo de tratamiento, lo que indica que los ratones tienen buena tolerancia a los ADC (Figura 22B); La inhibición del crecimiento tumoral del grupo administrado con 10 mpk B31-H3L3-MMAE por QW*3 es ligeramente superior a la del grupo administrado con 10 mpk 99961.1-MMAE por QW*3 (Tabla 17), pero todos los ratones alcanzan la remisión completa (RC, por sus siglas en inglés) aproximadamente 18 días después de la administración; el efecto de inhibición tumoral del grupo administrado con 5 mg/kg de B31-H3L3-MMAE por QW*3 es superior al del grupo administrado con 5 mg/kg de 99961.1-MMAE por QW*3, y 4/6 ratones alcanzan la RC el día 25 después de la administración. El grupo de dosis única de 10 mg/kg de B31-H3L3-MMAE muestra un efecto de inhibición tumoral superior en comparación con el grupo de dosis única de 10 mg/kg de 99961.1-MMAE, y el grupo de B31-H3L3-MMAE alcanza la RC en todos los ratones a los 18 días tras la administración, mientras que el grupo de 99961.1-MMAE experimenta recurrencia tumoral a los 20 días tras la administración. En este experimento, no se observó recidiva tumoral en todos los grupos B31-H3L3-MMAE (Figura 22A y tablas 16-17).

Tabla 16 Inhibición del crecimiento tumoral de ADC en ratones

	Inhibición del crecimiento tumoral (TGI (%)) = $(1 - \text{volumen tumoral medio del grupo experimental} / \text{volumen tumoral medio del grupo de control PBS}) \times 100\%$.						
Día de medición	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk,	99961.1-MMAE 5 mpk,	B31-MMAE 10 mpk,	B31-MMAE 5 mpk,	99961.1-MMAE 10 mpk,	B31-MMAE 10 mpk,

		QW*3	QW*3	QW*3	QW*3	Dosis única	Dosis única
35	0	38.24	38.52	46.53	38.37	21.17	29.08
38	0	60.49	56.66	70.18	52.31	45.57	50.62
42	0	84.96	68.58	91.94	74.83	74.09	84.41
45	0	94.6	84.17	99.44	84.77	78.07	94.13
49	0	100	92.84	100	93.52	77.26	100
51	0	100	96.69	100	96.83	74.59	100
56	0	100	98.21	100	98.02	64.31	100

Tabla 17 Tasa de remisión completa de ADC en ratones

Día de medición	Remisión completa (RC (%))						
	PBS	99961.1- MMAE 10 mpk, QW*3	99961.1- MMAE 5 mpk, QW*3	B31- MMAE 10 mpk, QW*3	B31- MMAE 5 mpk, QW*3	99961.1- MMAE 10 mpk, Monodosis	B31- MMAE 10 mpk, Dosis única
38	0	-	-	-	-	-	-
42	0	-	-	1/6	-	-	-
45	0	1/6	-	5/6	-	-	1/3
49	0	6/6	1/6	6/6	2/6	-	3/3
51	0	6/6	4/6	6/6	4/6	-	3/3
56	0	6/6	6/6	6/6	4/6	-	3/3

Ejemplo 27 Evaluación de la eficacia inhibidora del ADC en un modelo de ratón portador del tumor Jeko-1

En este ejemplo, se detectó el efecto antitumoral de un ADC candidato (B31-H3L3-MMAE) en animales. Las células tumorales utilizadas fueron células de linfoma de células del manto Jeko-1 (ATCC, CRL-3006), y se usó 99961.1-MMAE como control positivo.

El método específico fue el siguiente: Se utilizaron ratones desnudos hembra de 6-8 semanas de edad y un peso aproximado de 21-25 g (BALB/c, Zhejiang Weitong Lihua Laboratory Animal Technology Co., Ltd.), y se inyectaron 1×10^7 células Jeko-1 por vía subcutánea en la cara dorsal de cada ratón desnudo. Cuando el volumen del tumor alcanzó

unos 100 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en jaulas. Se dividieron 9 grupos, 7 ratones desnudos portadores de tumores por grupo, incluido un grupo de control negativo con PBS, 4 grupos de ADC (B31-H3L3-MMAE 2.5 mpk (mg/kg) (QW*3), B31-H3L3-MMAE 10 mpk (QW*3), B31-H3L3-MMAE 10 mpk (dosis única) y B31-H3L3-MMAE 2.5+3.5 mpk (Q2W*2, es decir, 2.5 mpk el día 15 y 3.5 mpk el día 29, abreviado como D15 2.5 mpk+D29 3.5 mpk)) y 4 grupos ADC de control positivo (99961.1-MMAE 2.5 mpk (QW*3), 99961.1-MMAE 10 mpk (QW*3), 99961.1-MMAE 10 mpk (dosis única) y 99961.1-MMAE 2.5+3.5 mpk (Q2W*2, es decir, 2.5 mpk en el día 15 y 3.5 mpk el día 29, abreviado como D15 2.5 mpk+D29 3.5 mpk)), el método de administración fue la inyección en la vena de la cola, un total de 3 administraciones/3 semanas (QW*3) o dosis única (dosis única) o 2 administraciones/3 semanas (Q2W*2). El volumen tumoral (V) se calculó de la siguiente manera: $V = L \times W^2 / 2$ (donde L es el diámetro tumoral más largo y W es el diámetro tumoral más corto). Se analizaron los datos del volumen tumoral y el cambio de peso corporal del ratón, y se calculó la inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados se muestran en las Figuras 23A-23B y en las Tablas 18-19.

Los resultados experimentales muestran que no hay cambios significativos en el peso corporal de los ratones de cada grupo durante el tratamiento, lo que indica que los ratones tienen una buena tolerancia al ADC (Figura 23B); los ratones de los grupos de administración QW*3, B31-H3L3-MMAE-10mpk y 99961.1-MMAE-10mpk tienen una tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI equivalente de aproximadamente el 96%, y no se observó recidiva tumoral 23 días después de la administración; los grupos de dosis B31-H3L3-MMAE-2,5mpk y 99961.1-MMAE-2,5mpk tienen un efecto antitumoral equivalente, con TGI del 60.47% y 59.22%, respectivamente. En los grupos de dosis única, los grupos de dosis B31-H3L3-MMAE (10 mpk) y 99961.1-MMAE (10 mpk) tienen un TGI del 79.24% y el 91.74%, respectivamente, y no se observó ninguna recidiva tumoral 23 días después de la administración. En los grupos de dosificación Q2W*2, el grupo de dosificación B31-H3L3-MMAE (2.5+3.5 mpk) tiene un efecto de inhibición tumoral comparable al del grupo 99961.1-MMAE (2.5+3.5 mpk), con TGI del 34.96% y 34.60%, respectivamente (Figura 23A y tablas 18-19).

Tabla 18 Inhibición del crecimiento tumoral de ADC en ratones

	Inhibición del crecimiento tumoral (TGI (%)) = $(1 - \text{volumen tumoral medio del grupo experimental} / \text{volumen tumoral medio del grupo de control PBS}) \times 100\%$.
--	--

Día de medición	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk, QW*3	99961.1-MMAE 2,5 mpk, QW*3	B31-H3L3-MMAE 10 mpk, QW*3	B31-H3L3-MMAE 2,5 mpk, QW*3
17	0	2.81	2.04	3.63	6.14
20	0	40.69	15.40	26.96	13.78
22	0	62.44	10.31	52.36	10.83
24	0	69.94	4.20	61.53	20.13
27	0	86.34	29.20	83.08	40.94
29	0	90.97	44.98	89.03	47.48
31	0	94.42	53.01	94.30	53.56
34	0	95.57	55.18	96.02	58.44
36	0	96.24	58.47	95.68	61.76
38	0	95.38	60.82	96.28	64.21
41	0	95.77	59.22	95.44	60.47

Tabla 19 Inhibición del crecimiento tumoral de ADC en ratones

Inhibición del crecimiento tumoral (TGI (%)) = (1-volumen tumoral medio del grupo experimental/volumen tumoral medio del grupo de control PBS) × 100%.					
Día de medición	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk, Dosis única	99961.1-MMAE 2,5(D15)/3,5(D29) mpk, Q2W*2	B31-H3L3-MMAE 10 mpk, Dosis única	B31-H3L3-MMAE 2,5(D15)/3,5(D29) mpk, Q2W*2
17	0	5.32	2.85	6.54	4.77
20	0	44.15	16.28	28.99	18.97
22	0	61.50	9.92	45.06	7.83
24	0	70.14	5.65	59.45	4.25
27	0	82.01	6.58	74.96	13.01
29	0	90.01	7.92	86.03	9.77
31	0	91.95	13.64	90.48	11.05
34	0	93.67	18.47	89.15	24.86
36	0	92.85	18.18	86.44	36.94

38	0	92.51	32.36	84.62	42.42
41	0	91.74	34.60	79.24	34.96

Lista de secuencias

SEQ ID NO:	Descripción de la secuencia	Información de secuencia
51	IgG1 Fc humana	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	Región constante de la cadena pesada hIgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	CL (KAPPA)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	B31 VL	DIQMNQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYVSWFQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSFTISSLEYEDMGIIYYCLQFDEFPPYTFGGGKLEIK
55	B31 VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQTPEKRLEWVASISRGGSTYYPDsvKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDtAMYyCASYFGNYDAMDYWGQGTSVTVSS

56	B62 VL	DIVLTQSPASLSMAIGKVTIRCVTSIDDDVNWYQKPGKPPK LLISAGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDVFTIENMLSEVDADY YCLQSDNLPYTFGGGGTKLEIK
57	B62 VH	DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYVMSWVRQ TPDKRLELVATINSNGGNTYYPDSVKGRFTISRDNANTLY LQMSSLKSEDTAMYYCARDLGLRRRDYAMDYWGQGTSTV TVSS
58	B32 VL	DIQITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGI YYCLQFDEFPYTFGGGGTKLEIK
59	B32 VH	EVKLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYAMSWVRQ TPDKRLEWVASINRDVTTYYPDSMKGRFTISRDNARNILYL QMSSLRSEDTAMYYCARGYYYGGGPYWHFDVWVGAGTT VTVSS
60	B74 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDIGI YYCLQIDEFPYTFGGGGTKLEIK
61	B74 VH	EVMLVESGGNLVKPGGSLKLSCAASGFTFSIYAMSWVRQT PEKRLEWVASISGGGTAYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDTAIYYCARGYYYGGSPYWHFDVWGAGTTVT VSS
62	B34 VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGI YYCLQYDEFPYTFGGGGTKLEIK
63	B34 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ TPEKRLEWVASISTGGSPYYPDSVKGRFTISRDNARNILYL QMSSLKSEDTAMYYCARGYYYNSSPHWYFAVWGAGTSVT VSS
64	B39 VL	DIKITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLSWFQKPGKS PKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYY CLQFDEFPYTFGGGGTKLEIK

65	B39 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQT PEKRLEWVASISTGASTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDAMYYCAREETTTAALYYAMDYWGQGTSTV SS
66	C38, C77 VL	DIQMTQSPSSMHASLGERVTITCKASQDINNYVSWFQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSFTISSLEYEDMG IYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
67	C38 VH	EVMLVESGGGLVLRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ TPDKRLEWVASINRDVTYYYPDSVKGRFTISRDNARNILYL QMSSLRSEDAMYYCARDYYYGSSLYYGM DYWGQGTSTV TVSS
68	C77 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSNYAMSWVRQ TPEKRLEWVASINSGVTYYYPDSVKGRFTVSRDNARNILYL HMTGLRSEDATYYCSRYYYYGGSPYWHFDVWGAGTTVT VSS
69	C42 VL	DIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSFIYWYQQKPGS SPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGTSLTISRMEAEDAATYY CQQWSNYHFTFGSGTKLEIK
70	C42 VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYIMSWVRQT PEKRLEWVATINSGGTNTYYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRSEDATYYCTRYNGNYVWFAYWGQGTSLTVSA
71	M71 VL	DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKP GKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLESEDM GIYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
72	M71 VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ TPEKRLEWVASINRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNARDILYL QMSSLRSEDATYYCARDYYYGSSLYNGMDFWGQGTSVIV SS
73	M78 VL	DIKITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGI YYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK

74	M78 VH	EVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ SPEKRLEWVASINRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNARDILYL QMSSLRSEDTAIYYCARDYYYGSNLYNGMDYWGQGTSVIV SS
75	B31-H1L1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ TPGKRLEWVASISRGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMSSLRAEDTAMYWCASYFGNYDAMDYWGQGT TVTVSS
76	B31-H2L2, B31-H2L3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ APGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMSSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGT TVTVSS
77	B31-H3L2, B31-H3L3, B31-H3L4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ APGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGT TVTVSS
78	B31-H4L2, B31-H4L3, B31-H4L4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISRGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGT TVTVSS
79	B31-H1L1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINNYVSWFQKPGK APKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYFTFTISLQPEDFAT YYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
80	B31-H2L2, B31-H3L2, B31-H4L2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINNYVSWFQKPGK APKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDF ATYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
81	B31-H2L3, B31-H3L3, B31-H4L3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDINNYVSWFQKPG KAPKSLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPED FATYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
82	B31-H3L4, B31-H4L4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDINNYLSWFQKPGK APKSLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK

83	B62-H1L1, B62-H1L2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQ TPGKRLELVATINSNGGNTYYPD SVKGRFTISRDN AKNTLY LQMSSLRAEDTAMYYCARD SLGLRRRDYAMDYWGQGTTV TVSS
84	B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H2L4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQ APGKGLELVATINSNGGNTYYPD SVKGRFTISRDN AKNTLY LQMGS LRAEDTAMYYCARD SLGLRRRDYAMDYWGQGTT VTVSS
85	B62-H3L2, B62-H3L3, B62-H3L4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQ APGKGLEYVATINSNGGNTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLY LQMGS LRAEDTAMYYCARD SLGLRRRDYAMDYWGQGTT VTVSS
86	B62-H1L1 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRV TIRC VT SIDDDVNWYQKPGKAP KLLISAGN TLRPGVPSRFSSSGYGTDF TFTISSMQPEDIATY YCLQSDNLPYTFGGG TKLEIK
87	B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H3L2 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRV TIRC VT SIDDDVNWYQKPGKAP KLLISAGN TLRPGVPSRFSGSGTDF TFTISSLQPEDIATYYC LQSDNLPYTFGGG TKLEIK
88	B62-H2L3, B62-H3L3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC VT SIDDDVNWYQKPGKAP KLLISAGN TLRPGVPSRFSGSGTDF TFTISSLQPEDIATYYC LQSDNLPYTFGGG TKLEIK
89	B62-H2L4, B62-H3L4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC QTSIDDDVNWYQKPGKA PKLLISAGN TLETGVPSRFSGSGTDF TFTISSLQPEDIATYY CLQSDNLPYTFGGG TKLEIK
90	Cadena ligera B31	DIQMNQSPSSMYASLGERV TITCKASQDINNYVSWFQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSFTISSLEYEDMG IYYCLQFDEFPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC

91	Cadena pesada B31	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ TPEKRLEWVASISRGGSTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYL QMSSLRSEDAMYYCASYFGNYDAMDYWGQGTSVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
92	Cadena ligera B62	DIVLTQSPASLSMAIGEKVTIRCVTSIDDDVNWYQKPGKPPK LLISAGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDVFTIENMLSEVDADY YCLQSDNLPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
93	B62 cadena pesada	DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYVMSWVRQ TPDKRLELVATINSNGGNTYYPDSVKGRFTISRDNANTLY LQMSSLKSEDAMYYCARDLGLRRRDYAMDYWGQGTSV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

94	Cadena ligera B32	DIQITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGI YYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
95	Cadena pesada B32	EVKLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYAMSWVRQ TPDKRLEWVASINRDVTTYYPDSMKGRFTISRDNARNILYL QMSSLRSEDAMYYCARGYYYGGGPYWHFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
96	Cadena ligera B74	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDIGI YYCLQIDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

97	Cadena pesada B74	EVMLVESGGNLVKPGGSLKLSCAASGFTFSIYAMSWVRQT PEKRLEWVASISGGGTAYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDTAIYYCARGYYYGGSPYWHFDVWGAGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
98	Cadena ligera B34	DIQMTQSPSSLSASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGI YYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
99	Cadena pesada B34	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ TPEKRLEWVASISTGGSPYYPDSVKGRFTISRDNARNILYL QMSSLKSEDTAMYYCARGYYYNSSPHWYFAVWGAGTSVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

100	Cadena ligera B39	DIKITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGI YYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
101	Cadena pesada B39	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSTYAMSWVRQT PEKRLEWVASISTGASTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDAMYYCAREETTTAALYYAMDYWGQGTSTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
102	C38, C77 cadena ligera	DIQMTQSPSSMHASLGERVTITCKASQDINNYVSWFQQKP GKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSFTISSLEYEDM GIYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

103	Cadena pesada C38	EVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ TPDKRLEWVASINRDVTTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYL QMSSLRSEDAMYYCARDYYYGSSLYYGMDYWGQGTSV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
104	Cadena pesada C77	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSNYAMSWVRQ TPEKRLEWVASINSGVTTYYPDSVKGRFTVSRDNARNILYL HMTGLRSEDTAIYYCSRGYYYGGSPYWHFDVWGAGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
105	Cadena ligera C42	DIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSFIYWYQQKPGS SPRLLIYDTSNLAGVPVRFSGSGTSLTISRMEAEDAATYY CQQWSNYHFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

106	Cadena pesada C42	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYIMSWVRQT PEKRLEWVATINSGGTNTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRSEDALYYCTRYNGNYVWFAYWGQGTTLVTVSAA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
107	Cadena ligera M71	DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKP GKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSELESDM GIYYCLQDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVV KSFNRGEC
108	Cadena pesada M71	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ TPEKRLEWVASINRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNARDILYL QMSSLRSEDALYYCARDYYYGSSLYNGMDFWGQGTSVIV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

109	Cadena ligera M78	DIKITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGI YYCLQDEFPTYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
110	Cadena pesada M78	EVMLVESGGGLVLRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ SPEKRLEWVASINRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNARDILYL QMSSLRSEDTAIYYCARDYYYGSNLYNGMDYWGQGTSVIV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
111	B31-H1L1 cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ TPGKRLEWVASISRGGSTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMSSLRAEDTAMYYCASYFGNYDAMDYWGQGTITVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

112	B31-H2L2, B31-H2L3 cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ APGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTLYL QMSSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
113	B31-H3L2, B31-H3L3, B31-H3L4 cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ APGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

114	B31-H4L2, B31-H4L3, B31-H4L4 cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISRGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKS LSLSPGK
115	Cadena ligera B31-H1L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYVSWFQKPGK APKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGQDYFTFTISSLQPEDFAT YYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
116	Cadena ligera B31-H2L2, B31-H3L2, B31-H4L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYVSWFQKPGK APKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDDYFTFTISSLQPED FATYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
117	Cadena ligera B31-H2L3, B31-H3L3, B31-H4L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYVSWFQKPG KAPKSLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPED FATYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

118	Cadena ligera B31-H3L4, B31-H4L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLSWFQQKP GKAPKSLIYRANRLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
119	B62-H1L1, B62-H1L2 cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMSWVRQ TPGKRLELVATINSNGGNTYYPDSVKGRFTISRDNANTLY LQMSSLRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
120	B62-H2L2, B62-H2L3, B62-H2L4 cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMSWVRQ APGKGLELVATINSNGGNTYYPDSVKGRFTISRDNANTLY LQMGSRLRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

121	B62-H3L2, B62-H3L3, B62-H3L4 cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQ APGKGGLEYVATINSNGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMGS LRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
122	Cadena ligera B62-H1L1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTIRC VT SIDDDVNWYQQKPGKA PKLLISAGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDFTFTISSMQPEDIAT YYCLQSDNLPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
123	Cadena ligera B62-H1L2, B62-H2L2, B62-H3L2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTIRC VT SIDDDVNWYQQKPGKA PKLLISAGNTLRPGVPSRFSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY CLQSDNLPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
124	Cadena ligera B62-H2L3, B62-H3L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCVTSIDDDVNWYQQKPGK APKLLISAGNTLRPGVPSRFSGSGTDFTFTISSLQPEDIATY YCLQSDNLPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC

125	Cadena ligera B62-H2L4, B62-H3L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCQTSIDIDDDVNWYQQKPG KAPKLLISAGNTLETGVPSRFGSGTDFTFTISSLQPEDIATY YCLQSDNLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
-----	---	---