

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 850 325**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/EP2015/073308**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055592**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15778294 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3204415**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos contra CD3 $\epsilon$  y ROR1**

30 Prioridad:

**09.10.2014 EP 14188378**

**14.10.2014 EP 14188727**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.08.2021**

73 Titular/es:

**ENGMAB SÀRL (100.0%)**

**route de Perreux 1**

**2017 Boudry, CH**

72 Inventor/es:

**VU, MINH DIEM;**

**STREIN, KLAUS;**

**AST, OLIVER;**

**FAUTI, TANJA;**

**FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER, ANNE;**

**HOSSE, RALF;**

**KLEIN, CHRISTIAN;**

**MOESSNER, EKKEHARD;**

**MOSER, SAMUEL;**

**MURR, RAMONA;**

**UMANA, PABLO;**

**JUNG-IMHOF, SABINE;**

**KLOSTERMANN, STEFAN;**

**MOLHOJ, MICHAEL;**

**REGULA, JOERG y**

**SCHAEFER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

ES 2 850 325 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos contra CD3 $\epsilon$  y ROR1

5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos biespecíficos contra CD3 $\epsilon$  y ROR1, su fabricación y uso.

**Antecedentes de la invención**

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

WO2011159847 se refiere a un anticuerpo anti-ROR1 como un conjugado con una molécula biológicamente activa para el tratamiento de cáncer con ROR1 como linfoma o adenocarcinoma. WO2008076868, WO2008103849, WO201008069, WO2010124188, WO2011079902, WO2011054007, WO2011159847, WO2012076066, WO2012076727, WO 2012045085 y WO2012097313 se refieren también a moléculas de unión a ROR1 o anticuerpos anti ROR1. WO2012075158 se refiere a un anticuerpo anti-ROR1 que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) la secuencia de SEQ ID NO: 2 y como dominio variable de cadena pesada (VH) la secuencia de SEQ ID NO: 6, y como respectivas CDRs las secuencias de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 7, 8, 9. Este anticuerpo se denomina además MAB1. El documento WO201209731 se refiere a un anticuerpo anti-ROR1 que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) la secuencia de SEQ ID NO: 45 y como dominio de variable de cadena pesada (VH) la secuencia de SEQ ID NO: 42. Este anticuerpo se denomina además MAB2. El documento WO2012075158 se refiere a un anticuerpo anti-ROR1 que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) la secuencia de SEQ ID NO: 46 y como dominio variable de cadena pesada (VH) la secuencia de SEQ ID NO: 43. Este anticuerpo se denomina además MAB3. El documento WO2012075158 se refiere a un anticuerpo anti-ROR1 que comprende como dominio variable de cadena ligera (VL) la secuencia de SEQ ID NO: 47 y como dominio variable de cadena pesada (VH) la secuencia de SEQ ID NO: 44. Este anticuerpo se denomina además MAB4.

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

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

El complejo TCR/CD3 de los linfocitos T consiste en heterodímero TCR alfa ( $\alpha$ )/beta ( $\beta$ ) o TCR gamma ( $\gamma$ )/delta ( $\delta$ ) coexpresado en la superficie celular con las subunidades invariables de gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), zeta ( $\zeta$ ), y eta ( $\eta$ ) marcados con CD3. CD3 $\epsilon$  humano se describe en UniProt P07766 (CD3E\_HUMAN). Un anticuerpo anti CD3 $\epsilon$  que se describe en el estado de la técnica es SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137: 1097-1100). SP34 reacciona con CD3 de primate y humano. SP34 está disponible de Pharmingen™ (BD Biosciences). Un anticuerpo anti CD3 adicional que se describe en el estado de la técnica es UCHT-1 (véase WO2000041474). Un anticuerpo anti CD3 adicional que se describe en el estado de la técnica es BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute, que se utiliza en los ensayos de Fase I/II de GvHD, Anasetti et al, Transplantation 54: 844 (1992)).

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

Un enfoque para evitar el problema de subproductos mispaired, que se conoce como 'knobs into holes', tiene por objeto forzar el apareamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes mediante la introducción de mutaciones en el CH3 de modificar la interfaz de contacto. En una cadena, los aminoácidos voluminosos fueron reemplazados por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "agujero". Por el contrario, los aminoácidos con cadenas laterales grandes se introdujeron en el otro dominio CH3, para crear un "botón". Al coexpresar estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que tienen que ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), altos rendimientos de formación de heterodímeros ('agujero de botón') versus formación de homodímeros ('agujero de agujero' o 'botón de botón ') (Ridgway JB, Presta LG, Carter P; y WO1996027011). El porcentaje de heterodímero podría incrementarse aún más remodelando las superficies de interacción de los dos dominios CH3 usando un enfoque de presentación de fagos y la introducción de un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant AM, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Arwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26 - 35). Se describen nuevos enfoques para la tecnología de botones en orificios, por ejemplo, en el documento EP 1870459A1. Aunque este formato parece muy atractivo, actualmente no se dispone de datos que describan la progresión hacia la clínica. Una limitación importante de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos parentales tienen que ser idénticas para evitar el apareamiento incorrecto y la formación de moléculas inactivas. Por tanto, esta técnica no es apropiada para desarrollar fácilmente anticuerpos biespecíficos recombinantes contra dos dianas partiendo de dos anticuerpos contra la primera y la segunda dianas, ya que las cadenas pesadas de estos anticuerpos y/o las cadenas ligeras idénticas tienen que optimizarse. Xie, Z., et al, J Immunol Methods 286 (2005) 95-101 se refiere a un formato de anticuerpo biespecífico que usa scFv en combinación con tecnología de botones en agujeros para la parte FC. WO2012116927 y WO2010145792 mencionan el intercambio de los dominios CH1 y CL. El documento WO2009080254 menciona construcciones de botones en los orificios para producir anticuerpos biespecíficos. El documento WO 2006093794 se refiere a composiciones de unión a proteínas heterodiméricas. El documento WO199937791 describe derivados de anticuerpos multipropósito. Morrison, SL y col., J. Immunol. 160 (1998) 2802-2808 se refiere a la influencia del intercambio de dominios de región variable sobre las propiedades funcionales de IgG.

El documento WO 201302362 se refiere a polipéptidos heterodimerizados. El documento WO201312733 se refiere a polipéptidos que comprenden regiones Fc heterodiméricas. El documento WO2012131555 se refiere a inmunoglobulinas heterodiméricas modificadas genéticamente. El documento EP 2647707 se refiere a inmunoglobulinas heterodiméricas modificadas genéticamente. WO2009080251, WO 2009080252, WO 2009080253, WO 2009080254 y Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-1191 se refieren a anticuerpos IgG bivalentes, biespecíficos con un dominio cruzado. Los anticuerpos multiespecíficos con reemplazo/intercambio de VH/VL en una unión para evitar el apareamiento incorrecto de cadenas ligeras (CrossMabVH-VL) que se describen en el documento WO2009080252 (véase también Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-1191) claramente reducir los subproductos causados por el desajuste de una cadena ligera contra un primer antígeno con la cadena pesada incorrecta contra el segundo antígeno (en comparación con enfoques sin dicho intercambio de dominio). Sin embargo, su preparación no está completamente libre de productos secundarios. El producto secundario principal se basa en una interacción de tipo Bence-Jones (Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-1191).

Por consiguiente, existe la necesidad de anticuerpos biespecíficos contra CD3 $\epsilon$  y ROR1 con intercambio VH/VL que puedan producirse con alto rendimiento y purificarse fácilmente.

El cáncer de ovario es la principal causa de muerte por cáncer ginecológico en los Estados Unidos y el séptimo cáncer más común y la octava causa más común de muerte por cáncer en las mujeres. Se estima que en 2014 se esperan 21.980 nuevos casos de cáncer de ovario y 14.270 muertes relacionadas con el cáncer de ovario en los Estados Unidos. En todo el mundo, se diagnosticará cáncer de ovario a casi 225.000 mujeres y más de 140.000 morirán a causa de la enfermedad (Cancer Facts & Figures 2014; <http://www.cancer.org>). La incidencia de cáncer de ovario aumenta con la edad y es más frecuente en la octava década de la vida. Aproximadamente la mitad de las mujeres diagnosticadas con cáncer de ovario tienen 63 años o más. El cáncer de ovario generalmente tiene un pronóstico relativamente precario. Si se diagnostica en la etapa localizada, la tasa de supervivencia a 5 años es del 92%, sin embargo, solo el 15% de todos los casos se detectan en esta etapa. La mayoría de los casos (61%) se

diagnostican después de que la enfermedad ya ha hecho metástasis. Para las mujeres diagnosticadas con metástasis a distancia, la tasa de supervivencia a 5 años es del 27%. A pesar de los avances en cirugía y quimioterapia durante las últimas dos décadas, solo se ha logrado un progreso modesto en la mejora de la supervivencia general en pacientes con cáncer de ovario. Aunque la mayoría de las mujeres con cáncer de ovario avanzado responden a la quimioterapia de primera línea, la mayoría de las respuestas no son duraderas. Más del 80% de los pacientes tendrán una recurrencia de su enfermedad después del tratamiento de primera línea, y más del 50% morirá de la enfermedad recurrente dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico (<http://www.cancerresearch.org>). La terapia dirigida es un tipo más nuevo de tratamiento contra el cáncer que usa medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar las células cancerosas sin dañar las células normales. El fármaco de terapia dirigida que más se ha estudiado en el cáncer de ovario es el bevacizumab (Avastin®). En estudios, se ha demostrado que bevacizumab reduce o ralentiza el crecimiento de los cánceres de ovario avanzados. Los ensayos para ver si el bevacizumab funciona incluso mejor cuando se administra junto con la quimioterapia han mostrado buenos resultados en términos de reducción (o detención del crecimiento de) tumores, pero aún no se ha demostrado que ayude a las mujeres a vivir más tiempo (<http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer>). El documento WO2007146957 se refiere a la inhibición del crecimiento tumoral con agentes antagonistas de ROR1. Dichos agentes pueden ser, por ejemplo, anticuerpos contra ROR1 e identificarse mediante el cribado con líneas de células tumorales. Como tal, se mencionan líneas de células tumorales de cribado líneas celulares de cáncer de ovario. El documento US8212009 se refiere a un procedimiento para tratar un cáncer relacionado con ROR1 en un sujeto. Los cánceres relacionados con ROR1 son, entre otros, también cáncer de ovario. El documento WO2011054007 se refiere a un procedimiento para el tratamiento del cáncer de ovario que comprende la administración de un anticuerpo contra ROR1. Por consiguiente, existe la necesidad de un agente basado en ROR1 para el tratamiento del cáncer de ovario.

### **Características de la invención**

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas humanas CD3ε (denominada también como "CD3") y el dominio extracelular de ROR1 humana (denominado también como "ROR1"). En base a la divulgación que se incluye en el presente documento, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3ε humano y al dominio extracelular de ROR1 humano, que comprende:

a) un primer Fab que se une específicamente al dominio extracelular de ROR1 humano, en el que el primer Fab comprende una primera cadena ligera y una primera cadena pesada, en el que la primera cadena ligera comprende un dominio variable VL y un dominio constante CL, y en el que la primera cadena pesada comprende un dominio variable VH y un dominio constante CH1; y

b) un segundo Fab que se une específicamente a CD3ε humano, en el que el segundo Fab comprende una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada, en el que la segunda cadena ligera es una cadena ligera de entrecruzamiento que comprende un dominio variable VH y un dominio constante CL, y en el que la segunda cadena pesada es una cadena pesada de entrecruzamiento que comprende un dominio variable VL y un dominio constante CH1; y en el que

en el dominio constante CL de la primera cadena ligera, el aminoácido en la posición 123 y el aminoácido en la posición 124 están sustituidos independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada, el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice UE de Kabat).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3ε humana y el dominio extracelular de ROR1 humano, que comprende:

a) un primer Fab que se une específicamente al dominio extracelular de ROR1 humano, en el que el primer Fab comprende una primera cadena ligera y una primera cadena pesada, en el que la primera cadena ligera comprende un dominio variable VL y un dominio constante CL, y en el que la primera cadena pesada comprende un dominio variable VH y un dominio constante CH1; y

b) un segundo Fab que se une específicamente a CD3ε humano, en el que el segundo Fab comprende una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada, en el que la segunda cadena ligera es una cadena ligera de entrecruzamiento que comprende un dominio variable VH y un dominio constante CL, y en el que la segunda cadena pesada es una cadena pesada de entrecruzamiento que comprende un dominio variable VL y un dominio constante CH1; y en el que

en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera, el aminoácido en la posición 123 y el aminoácido en la posición 124 están sustituidos independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada, el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico de la invención que comprende las etapas de

a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo de la invención,

- b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
- c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

5 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y cadenas pesadas de un anticuerpo biespecífico de la invención.

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

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

### **RESUMEN DE ASPECTOS IMPORTANTES DE LA DIVULGACIÓN**

15 Preferiblemente, en el dominio constante CL el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K), en el dominio constante CH1 el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos por ácido glutámico (E). Preferiblemente, además, el dominio constante CL en el aminoácido en la posición 123 está sustituido por arginina (R).

20 Preferiblemente, en el dominio constante CL el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K), en el dominio constante CH1 el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos por ácido glutámico (E). Preferiblemente, además, en el dominio constante CL en el aminoácido en la posición 123 está sustituido por lisina (K).

25 En un aspecto, el anticuerpo biespecífico puede consistir en un fragmento Fab de un anticuerpo de unión específica a CD3 (llamado también adicionalmente como "CD3-Fab"), y un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a ROR1 (llamado también adicionalmente como "ROR1-Fab(s)") y una parte Fc, en donde el CD3-Fab y el ROR1-Fab están enlazados a través de sus extremos C-terminales a la región bisagra de dicha parte Fc. El CD3-Fab o el ROR1-Fab comprenden una sustitución de aa y el CD3-Fab comprende el entrecruzamiento (Figuras 30 1A y 1B).

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico puede consistir en un CD3-Fab, y un ROR1-Fab y una parte Fc, en el que el CD3-Fab y el ROR1-Fab están unidos a través de su C-terminal a la región bisagra de dicha parte Fc y un 35 segundo ROR1-Fab, que está unido con su extremo C-terminal al extremo N-terminal del CD3-Fab. El CD3-Fab comprende entrecruzamiento y el CD3-Fab o ambos ROR1-Fab comprenden una sustitución (Figuras 1C, 1D, 1F, 1G). Se prefiere especialmente un anticuerpo biespecífico que comprende ROR1-Fab-Fc-CD3-Fab-ROR1-Fab, en el que ambos ROR1-Fab comprenden una sustitución de aa y el CD3-Fab comprende entrecruzamiento VL/VH (Figura 1C). Se prefiere especialmente un anticuerpo biespecífico que consiste en ROR1-Fab-Fc-CD3-Fab-ROR1-Fab, en el que ambos ROR1-Fab comprenden una sustitución de Q124K, E123R, K147E y K213E (cadena ligera kappa) o 40 E124K, E123K, K147E y K213E (cadena ligera lambda) y el CD3-Fab comprende el cruce VL/VH. Se prefiere especialmente un anticuerpo biespecífico que consiste en ROR1-Fab-Fc-CD3-Fab-ROR1-Fab, en el que ambos ROR1-Fab comprenden una sustitución de Q124K, E123R, K147E y K213E (cadena ligera kappa) o E124K, E123K, K147E y K213E (cadena ligera lambda) y el CD3-Fab comprende el entrecruzamiento VL/VH. Es especialmente preferido que ambos ROR1-Fab comprendan como CDR las CDR del anticuerpo MAB1, o como VH/VL el VH/VL de 45 MAB1.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico puede consistir en dos ROR1-Fab y una parte Fc, en el que los ROR1-Fab están unidos por medio de sus C-terminales a la región bisagra de dicha parte Fc y un CD3-Fab, que está unido con su extremo C al extremo N de un ROR1-Fab. El CD3-Fab comprende entrecruzamiento y el CD3-Fab o ambos 50 ROR1-Fab comprenden una sustitución (Figuras 1F y 1G).

En aún otro aspecto, el anticuerpo biespecífico puede consistir en un CD3-Fab, que está unido a través de su extremo C-terminal a la región bisagra de dicha parte Fc y un ROR1-Fab, que está unido con su C-terminal al N-terminal del CD3-Fab. El CD3-Fab comprende entrecruzamiento y el CD3-Fab o el ROR1-Fab comprenden una 55 sustitución de aa (Figuras 1H y 1I).

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico puede consistir en un ROR1-Fab, que está unido a través de su C-terminal a la región de bisagra de dicha parte Fc y un CD3-Fab, que está unido con su C-terminal al N-terminal del ROR1-Fab. El CD3-Fab comprende entrecruzamiento y el CD3-Fab o el ROR1-Fab comprenden una sustitución de 60 aa (Figuras 1J y 1K).

En aspectos adicionales, los anticuerpos biespecíficos según la invención pueden tener las siguientes características:

- a) es del constructo ROR1 Fab - Fc - CD3 Fab - ROR1 Fab,
- 65 b) comprende entrecruzamiento VL/VH dentro del fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3,
- c) comprende una parte de IgG1Fc humana,

d) comprende dentro de la parte Fc la sustitución de Pro329 por glicina y sustituciones de Leu234 por alanina y Leu235 por alanina, y

e) en el dominio constante CL de ambos Fab ROR1, el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K) y en la posición 123 por arginina (R) para una cadena ligera kappa y lisina (K) para una cadena ligera lambda, en el dominio constante CH1 el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos por ácido glutámico (E).

Los fragmentos Fab se unen químicamente entre sí mediante el uso de un enlazador apropiado de acuerdo con el estado de la técnica. Los enlazadores apropiados se describen, por ejemplo, en US 20140242079. Preferiblemente se usa un enlazador (Gly4-Ser1)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 19) (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug; 7 (8): 1027-33 y Mack M. et al., PNAS 18 de julio de 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). El enlace entre dos fragmentos Fab se realiza entre las cadenas pesadas. Por tanto, el extremo C-terminal de CH1 de un primer fragmento Fab está unido al extremo N-terminal de VH del segundo fragmento Fab (sin entrecruzamiento) o con VL (cruzamiento). El enlace entre un fragmento Fab y la parte Fc se realiza según la invención como enlace entre CH1 y CH2.

El primer y un segundo fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a ROR1 se derivan preferiblemente del mismo anticuerpo y, preferiblemente, son idénticos en las secuencias de CDR, las secuencias de dominio variable de VH y VL y/o el dominio constante secuencias CH1 y CL. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos del primer y segundo fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a ROR1 son idénticas. Preferiblemente, el anticuerpo ROR1 es un anticuerpo que comprende las secuencias CDR del anticuerpo MAB1, un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL del anticuerpo MAB1, o un anticuerpo que comprende las secuencias VH, VL, CH1 y CL del anticuerpo MAB1.

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico comprende como fragmentos Fab y parte Fc, no más de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3, no más de dos fragmentos Fab de un anticuerpo anti-ROR1 y no más de una parte Fc, preferiblemente una parte Fc humana. Preferiblemente, el segundo fragmento Fab de un anticuerpo anti-ROR1 se une a través de su extremo terminal C al extremo terminal N del fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 o a la región bisagra de la parte Fc. Preferiblemente, el enlace se realiza entre CH1 de ROR1-Fab y VL de CD3-Fab (entrecruzamiento VL/VH).

Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano, preferiblemente el fragmento Fab, se caracteriza en que comprende un dominio variable VH que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, 13 y 14 como la cadena pesada respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 y un dominio variable VL que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, 16 y 17 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera respectivamente del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  (CDR MAB CD3 H2C). Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano se caracteriza porque los dominios variables son de SEQ ID NO: 10 y 11 (VHVL MAB CD3 H2C).

Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano, preferiblemente el fragmento Fab, se caracteriza en que comprende un dominio variable VH que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 23, 24 y 25 como la cadena pesada respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 y un dominio variable VL que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 26, 27 y 28 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera respectivamente del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  (CDR MAB CD3 CH2527). Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano se caracteriza porque los dominios variables son de SEQ ID NO: 21 y 22 (VHVL MAB CD3).

Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a ROR1 humano se caracteriza en que comprende un dominio variable VH que comprende CDR de cadena pesada CDR1H de la SEQ ID NO: 7, un CDR2H de la SEQ ID NO: 8, un CDR3H de SEQ ID NO: 9 y que comprende un dominio variable VL que comprende las CDR de cadena ligera CDR1L de SEQ ID NO: 3, una CDR2L de SEQ ID NO: 4, una CDR3L de SEQ ID NO: 5 (CDR MAB1).

Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a ROR1 humana se caracteriza en que comprende un VH de SEQ ID NO: 6 y un VL de la SEQ ID NO: 2 (VHVL mAb1).

El anticuerpo biespecífico se puede caracterizar por un conjunto cadena pesada y ligera de polipéptidos SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, y SEQ ID NO: 40.

Alternativamente, el anticuerpo biespecífico se puede caracterizar por un conjunto cadena pesada y ligera de polipéptidos SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, y SEQ ID NO: 41

La descripción proporciona además un conjunto de ácidos nucleicos que codifican un conjunto de cadenas pesada y ligera respectivamente.

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico que comprende regiones pesadas constantes CH2/CH3 de subclase IgG1 se caracteriza en que comprende las mutaciones L234A, L235A y P239G (numeración de acuerdo con el

índice EU de Kabat) para evitar la unión de FcR y C1q y la minimización de ADCC/CDC. La ventaja es que dicho anticuerpo de la invención media su eficacia de destrucción de células tumorales puramente por el poderoso mecanismo de redirección/activación de células T. Se evitan mecanismos de acción adicionales como los efectos sobre el sistema del complemento y sobre las células efectoras que expresan FcR y se reduce el riesgo de efectos secundarios.

En un aspecto particular, la descripción proporciona un anticuerpo biespecífico que consiste en (de N a C-terminal) VH(ROR1)-CH1(ROR1)-VL(CD3)-CH1(CD3)-CH2-CH3, preferiblemente de SEQ ID NO: 37, así como los respectivos ácidos nucleicos codificantes. Estos polipéptidos y los ácidos nucleicos respectivos son útiles para la producción de un anticuerpo biespecífico según la invención.

Los intercambios de aminoácido (aa) (mencionados además como "variantes de carga") fuera de las CDR de los anticuerpos biespecíficos proporcionan una producción/purificación considerablemente mejorada sin cambiar las propiedades biológicas como la unión a ROR1. Mediante la introducción de los intercambios de aa (variantes de carga), el apareamiento incorrecto de LC de la cadena ligera y la formación de productos secundarios en la producción se reduce significativamente y, por lo tanto, se facilita la purificación.

También se describe un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos CD3ε humanos diana y el dominio extracelular de ROR1 humano que no se internaliza. Tal anticuerpo se caracteriza preferiblemente por no internalizarse en una concentración de 1 nM en células B-CLL primarias a 37°C durante dos horas. Dicho anticuerpo también puede caracterizarse preferiblemente porque el anticuerpo biespecífico no se internaliza en un ensayo basado en células a 37 °C durante 2 horas, usando células B-CLL primarias ROR1 positivas y se usa a una concentración de anticuerpo de 1 nM, por lo que no se internaliza significa que la intensidad de fluorescencia media (MFI), detectada por citometría de flujo, de un anticuerpo biespecífico tras la unión a células B-CLL primarias ROR1-positivas medidas en el tiempo 0 no se reduce más del 50%, preferiblemente no más del 30% cuando se vuelve a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C.

El anticuerpo bivalente puede además caracterizarse en que comprende un anticuerpo anti-ROR1 monovalente que se une específicamente a ROR1, y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3. Se prefiere un anticuerpo bivalente si dicha intensidad de fluorescencia media (MFI), detectada por citometría de flujo, tras la unión a células positivas para ROR1 medida en el tiempo 0 no se reduce más del 50%, preferiblemente no más del 30% por internalización cuando se vuelve a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo bivalente y se caracteriza por comprender un anticuerpo anti-ROR1 monovalente que se une específicamente a ROR1 y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3. Preferiblemente, el anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3 es un fragmento Fab, preferiblemente un CrossFab de CD3. Se prefiere un anticuerpo bivalente de este tipo si dicha intensidad media de fluorescencia (MFI), detectada por citometría de flujo, tras la unión a células positivas para ROR1 medidas en el tiempo 0 no se reduce más del 50%, preferiblemente no más del 30% por internalización cuando se volvió a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo trivalente y se caracteriza por comprender un anticuerpo anti-ROR1 bivalente que se une específicamente a ROR1 y un anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3. Preferiblemente, el anticuerpo monovalente que se une específicamente a CD3 es un fragmento Fab o preferiblemente un crossFab de CD3. Se prefiere un anticuerpo trivalente si dicha intensidad de fluorescencia media (MFI), detectada por citometría de flujo, tras la unión a células positivas para ROR1 medidas en el tiempo 0 no se reduce más del 50%, preferiblemente no más del 30% por internalización cuando volvió a medir después de una incubación de 2 horas a 37 °C.

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico no se internaliza en dicho ensayo basado en células a 37 °C durante 24 horas.

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

En un aspecto adicional, la descripción proporciona un anticuerpo biespecífico con una relación de afinidad de ROR1 a CD3 de 5000:1 a 5:1, según lo determinado por los valores de Kd usando resonancia de plasmón superficial. Dicho anticuerpo es favorable debido a su unión más fuerte a las células malignas que a las células T. Preferiblemente, los valores de Kd son aproximadamente 100 nM para el anticuerpo CD3 y aproximadamente de 50 pM a 50 nM para el anticuerpo ROR1.

Preferiblemente, las células B-CLL se utilizan en una concentración de células de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml (PBMC primaria de pacientes con CLL) o 1 x 10<sup>6</sup> células/ml (ATCC CCL-155) o 1 x 10<sup>6</sup> células/ml (ATCC CRL-3004).

Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 se caracteriza por ser humanizada. Preferiblemente, el Mab CD3 de acuerdo con la invención se une al mismo epítipo de CD3ε que el anticuerpo H2C (descrito en el documento WO2008119567) y/o el anticuerpo CH2527 (descrito en el documento WO2013026839) o es preferiblemente el anticuerpo H2C o CH2527.

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

También se describe un procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico, tal como se describe en el presente documento, que comprende las etapas de transformar una célula huésped con uno o más vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o fragmentos respectivos, cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

Preferiblemente, el procedimiento para la preparación del anticuerpo biespecífico comprende las etapas de  
 a) transformar una célula huésped con uno o más vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican el conjunto de polipéptidos de cadena pesada y ligera SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40, o el conjunto de SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 41  
 b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y  
 c) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

También se proporciona en este documento una célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo tal como se describe.

También se proporciona una célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a la primera diana y vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo se une específicamente a la segunda diana, en el que los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un ejemplo preferido adicional de la descripción es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento para su uso como un medicamento. En particular, el anticuerpo descrito en el presente documento, o una composición farmacéutica que lo contiene, se puede utilizar en el tratamiento de neoplasias hematológicas hematológicas positivas para ROR1 que comprenden leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de zona marginal (MZL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), mieloma múltiple (MM) y linfoma folicular (FL). ROR1 se expresa de manera significativa y uniforme en la superficie celular de estos diversos cánceres de sangre. Alternativamente, puede usarse en el tratamiento de leucemias y linfomas no Hodgkin que expresan ROR1. También se puede utilizar en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL) del linaje de células B (B-CLL). B-CLL es el resultado de una mutación adquirida en el ADN de una sola célula de la médula ósea que se convierte en un linfocito B. Una vez que la célula de la médula ósea sufre el cambio leucémico, se multiplica en muchas células y con el tiempo desplaza a las células normales, ya que las células de CLL crecen y sobreviven mejor que las células normales. El resultado es el crecimiento descontrolado de células CLL en la médula ósea, lo que lleva a un aumento en el número de células CLL en la sangre. Los síntomas de la CLL generalmente se desarrollan con el tiempo y algunos pacientes permanecen asintomáticos y solo presentan resultados anormales en los análisis de sangre (por ejemplo, aumento de los glóbulos blancos). Los pacientes con CLL con síntomas experimentan fatiga, dificultad para respirar, anemia, pérdida de peso, disminución del apetito, agrandamiento de los ganglios linfáticos y del bazo e infecciones recurrentes debido a niveles bajos de inmunoglobulinas y recuentos reducidos de neutrófilos (Leukemia & Lymphoma Society, 2009).

Un anticuerpo tal como se describe en el presente documento, o una composición farmacéutica que lo comprende, también se puede usar en el tratamiento de trastornos de células plasmáticas tales como mieloma múltiple MM u otros trastornos de células B que expresan ROR1. El MM es una neoplasia maligna de células B caracterizada por una expansión monoclonal y acumulación de células plasmáticas anormales en el compartimento de la médula ósea. MM también implica células B clonales circulantes con el mismo reordenamiento del gen de IgG e hipermutación somática. El MM surge de una afección premaligna asintomática llamada gammapatía monoclonal de significancia desconocida (GMSI), caracterizada por niveles bajos de células plasmáticas de la médula ósea y una



proteína monoclonal. Las células MM proliferan a baja velocidad. El MM es el resultado de una aparición progresiva de múltiples cambios cromosómicos estructurales (por ejemplo, translocaciones desequilibradas). El MM implica la interacción mutua de las células plasmáticas malignas y el microambiente de la médula ósea (por ejemplo, células estromales normales de la médula ósea). Los signos clínicos de MM activo incluyen pico de anticuerpos monoclonales, células plasmáticas que sobrepoblan la médula ósea, lesiones óseas líticas y destrucción ósea como resultado de la sobreestimulación de los osteoclastos (Dimopoulos & Terpos, Ann Oncol 2010; 21 supl. 7: vii143-150).

Un anticuerpo tal como se describe en el presente documento, o una composición farmacéutica que lo comprende, también se puede usar en el tratamiento de tumores sólidos ROR1-positivos tales como cánceres humanos de mama (Zhang S, PLoS One 2012; 7 (3): e31127) y cánceres de pulmón (Yamaguchi T, Cancer Cell 2012; 21 (3): 348).

En particular, se puede utilizar en el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, y/o cáncer de páncreas. Cuando el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico y/o cáncer de páncreas y malignidad hematológica, el anticuerpo o la composición que lo contiene se puede administrar antes, después o al mismo tiempo que la quimioterapia o la radiación.

Preferiblemente, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento, o una composición farmacéutica que lo comprende, se administra una vez o dos veces a la semana preferiblemente a través de la administración subcutánea (por ejemplo, preferiblemente en el intervalo de dosis de 0,1 a 10 mg/m<sup>2</sup> una vez o dos veces a la semana). Si tiene actividades de citotoxicidad superiores, puede administrarse en una magnitud menor del intervalo de dosis clínica en comparación con los anticuerpos monoespecíficos convencionales o los anticuerpos biespecíficos convencionales que no son biespecíficos de células T (es decir, no se unen a CD3 en un brazo). Se prevé que, para un anticuerpo según la invención, se prefiere la administración subcutánea en el entorno clínico (por ejemplo, en el intervalo de dosis de 0,1 a 10 mg/m<sup>2</sup> una o dos veces por semana). Un anticuerpo como se describe a continuación debe eliminarse preferiblemente con una vida media de aproximadamente varios días, lo que permite una administración al menos una o dos veces por semana. Una ventaja de los anticuerpos descritos en este documento es un peso molecular (es decir, aproximadamente 150-200 kDa) mayor que el límite de tamaño de filtración renal (50-70 kDa). Este peso molecular permite una vida media de eliminación prolongada y posibilita la administración subcutánea una o dos veces por semana.

Preferiblemente, un anticuerpo como se describe en este documento se caracteriza por que muestra la inhibición del crecimiento tumoral de más de 70%, preferiblemente de más de 85%, preferiblemente de cerca de 100% en un modelo de xenoinjerto con una línea celular tumoral que expresa ROR1 (por ejemplo líneas celulares CLL, MM, MCL) a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal (BW) administrada por vía intravenosa (iv) o subcutánea (sc) o intraperitoneal (ip) dos veces por semana o una vez por semana, preferiblemente 0.5 mg/kg de peso corporal administrado iv o ip o sc dos veces a la semana o una vez a la semana, preferiblemente a 0,1 mg/kg de peso corporal administrado iv o ip o sc dos veces por semana o una vez a la semana, preferiblemente a 0,05 mg/kg de peso corporal administrado iv o ip o sc dos veces por semana o una vez a la semana, preferiblemente a 0,01 mg/kg de peso corporal administrados iv o ip o sc dos veces por semana o una vez a la semana, preferiblemente a 5 µg/kg de peso corporal administrados iv o ip o sc dos veces a la semana o una vez a la semana.

Preferiblemente un anticuerpo descrito en este documento se caracteriza por una vida media de eliminación en ratones, preferiblemente monos cynomolgus de más de 12 horas, preferiblemente 3 días o más. Los anticuerpos biespecíficos que se unen a una diana en las células tumorales y al CD3 y que tienen el formato molecular (scFv)<sub>2</sub> tienen una vida media de eliminación muy corta de 1 a 4 horas. En los ensayos clínicos con el anticuerpo CD19xCD3 biespecífico (scFv)<sub>2</sub> blinatumomab, este compuesto tuvo que ser administrado a través de una bomba llevada por los pacientes durante semanas y meses (Topp et al. J Clin Oncol 2011; 29 (18): 2493-8). En comparación con la administración iv o sc dos veces por semana o una vez por semana, el tratamiento administrado mediante una bomba es mucho menos conveniente para los pacientes y también mucho más arriesgado (por ejemplo, fallo de la bomba, problemas con el catéter).

Preferiblemente un anticuerpo descrito en esta memoria se caracteriza en que muestra un valor de CE50 para la unión a líneas celulares ROR1-positivos (por ejemplo, células RPMI8226, células Rec-1, células Jeko) de 30 nM o inferior, preferiblemente un valor de CE50 de 15 nM y inferior.

Preferiblemente, un anticuerpo tal como se describe en la presente memoria se caracteriza por su capacidad de inducir la eliminación redirigida de células tumorales que expresan ROR1 (por ejemplo, células RPMI8226, células Rec-1, células Jeko) en presencia de células T humanas con una CE50 inferior a 10 nM, preferiblemente 1 nM, preferiblemente 0,05 nM, preferiblemente 0,02 nM, preferiblemente 0,002 nM y menos.

La estabilidad de los anticuerpos biespecíficos puede verse afectada en condiciones prácticas y aplicaciones clínicas. A pesar de las recientes mejoras en la ingeniería de anticuerpos, algunas proteínas recombinantes y formatos moleculares (por ejemplo, fragmentos de scFv) tienden a desnaturalizarse y formar agregados más fácilmente que otros en condiciones de estrés (Worn y Pluckthun. J Mol Biol 2001; 305, 989-1010). Preferiblemente,

un anticuerpo de acuerdo con esta invención se caracteriza porque dicho anticuerpo almacenado en tampón de formulación estándar a 37 °C preferiblemente a 40 °C, durante 10 días, preferiblemente hasta 2 semanas, preferiblemente hasta 4 semanas, no da como resultado más de 10% de cambios ( $\Delta$ ), preferiblemente no más de 5% de cambios ( $\Delta$ ), en especies de alto peso molecular (HMW) y/o especies de bajo peso molecular (LMW) y/o contenido de monómeros en comparación con dicho anticuerpo almacenado en el mismo tampón de formulación a -80 °C durante el mismo período de almacenamiento.

### **Descripción de las Figuras**

10 Observación: si no se menciona que Mab2 se utilizó como anticuerpo anti-ROR1 y/o como Fab anti-ROR1 en un anticuerpo TCB anti-ROR1/anti-CD3 en las siguientes descripciones de las figuras, entonces Mab 1 se utilizó como anticuerpos anti -ROR1 y/o como Fab anti-ROR1 en un anticuerpo TCB anti-ROR1/anti-CD3.

15 Figura 1A-K. Anticuerpos biespecíficos preferidos que comprenden los fragmentos Fab (específicos de CD3 y ROR1) como se especifica: (1A, 1B) Fab ROR1-Fc Fab CD3; (1C, 1D) Fab ROR1-Fc-Fab CD3-Fab ROR1; (1F, 1G) Fab ROR1-Fc-Fab ROR1-Fab CD3; (1H, 1I) Fc-Fab CD3-Fab ROR1; (1J, 1K) Fc-Fab ROR1-Fab CD3. Preferiblemente, los Fabs CD3 incluyen un cruzamiento VH-VL para reducir el apareamiento incorrecto de LC y los productos secundarios. Fab CD3 y Fab ROR1 están enlazados entre sí con enlazadores flexibles.

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

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

30 Figura 3-1. Producción y purificación de 83A10-TCB sin variante de carga frente a 83A10-TCBcv con variante de carga. Gráfico SEC-SDS (no reducidos) de las preparaciones proteicas finales después de diferentes procedimientos de purificación para anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. Etapas de purificación de cromatografía de afinidad de proteína A (PA) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) aplicados al anticuerpo 83A10-TCB (A). (B) Etapas de purificación adicionales: cromatografía de intercambio catiónico (cIEX) y etapas cromatográficas de exclusión por tamaño final (re-SEC) aplicadas a las preparaciones de proteínas finales en (A). (C) Anticuerpo 83A10-TCBcv después de las etapas de purificación de PA + cIEX + SEC. Las moléculas 83A10-TCB y 83A10-TCBcv son ambas de formato molecular como se describe en la Figura 2a de PCT/EP2015/067841.

35 Figura 3-2. Estudio comparativo cabeza a cabeza: producción de 83A10-TCB sin carga frente a 83A10-TCBcv con variante de carga. Las propiedades (por ejemplo, pureza, rendimiento, contenido de monómero) de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se midieron en paralelo y se compararon después de cada etapa de purificación 1) cromatografía de afinidad PA solamente (A, B), 2) cromatografía de afinidad PA, después SEC (C, D) y 3) cromatografía de afinidad PA, después SEC, después cIEX y re-SEC (E, F). Gráfico SEC-SDS (no reducidos) de las soluciones proteicas finales después de los respectivos procedimientos de purificación de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. (A) Etapa de purificación por cromatografía de afinidad PA aplicada al anticuerpo 83A10-TCB. (B) Etapa de purificación por cromatografía de afinidad de PA aplicada al anticuerpo 83A10-TCBcv. (C) Cromatografía de afinidad PA + Etapas de purificación SEC aplicadas al anticuerpo 83A10-TCB. (D) Cromatografía de afinidad PA + Etapas de purificación SEC aplicadas al anticuerpo 83A10-TCBcv. (E) Cromatografía de afinidad PA +/- etapas de purificación SEC + cIEX + SEC aplicadas al anticuerpo 83A10-TCB. (F) Cromatografía de afinidad PA +/- etapas de purificación SEC + cIEX + SEC aplicadas al anticuerpo 83A10-TCBcv. Se midieron la pureza, el rendimiento y el contenido de monómeros. Porcentaje de molécula correcta detectada por cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS).

40 Figura 3-3. Unión de IgG ROR1 (Mab2 ROR1, símbolos abiertos) y anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 (ROR1 Mab2-TCBcv, símboloSECrrados) a las líneas celulares de cáncer de ovario SK-OV-3 (A) y PA-1 (B) medido por un aumento en la señal de intensidad de fluorescencia media en función de las concentraciones de anticuerpos. No se observó señal con la unión de TCB de control a CD3 solamente y no a ROR1 probado en las líneas celulares de cáncer de ovario SK-OV-3 y PA-1 (A y B; círculoSECrrados).

45 Figura 3-4. Unión de anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 a células T Jurkat. Se observó una unión dependiente de la concentración de ROR1 Mab2-TCBcv (cuadrados) y control-TCB (círculos) en las células T Jurkat, lo que confirma que ambos anticuerpos TCB se unen a CD3 en las células T.

50 Figura 4. Índice de internalización (%) de (A, B) anticuerpo IgG1 anti-ROR1 a una concentración de 1 nM y (A, C) anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 en células primarias de B-CLL positivas de ROR1 después de la incubación de 2 horas a 37 °C, tal como se detecta por FACS utilizando el anticuerpo anti-Fc humano marcado secundario (detección indirecta). (A, B) Anticuerpo IgG anti-ROR1 (1 nM) internalizado aproximadamente 12,5% en células

primarias de B-CLL. (A, C) Anticuerpo TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 (1 nM) mostró un índice de internalización de 27,1% en las células primarias de B-CLL en las mismas condiciones experimentales que como se mide por FACS (detección indirecta). La internalización se calculó basándose en el valor de MFI en el tiempo 0, la línea de base, y se calculó utilizando la fórmula descrita anteriormente.

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

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

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

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

Figura 8. La unión de anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en células RPMI8226 positivas de ROR1. La intensidad de fluorescencia media representada en función de las concentraciones de anticuerpo (de 0,14 a 100 nM).

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

Figura 9-1. Regulación positiva de los marcadores de activación de células T por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en presencia de células diana de cáncer de ovario. La expresión de los marcadores de activación se determinó midiendo la intensidad de fluorescencia media activada en las poblaciones de células T CD4+ y CD8+. ROR1 Mab2-TCBcv (cuadrados) indujo un aumento dependiente de la concentración del marcador de activación temprana CD69 que se observó en células T CD4+ (A) y células T CD8+ (B) en presencia de células diana SK-OV-3 de baja expresión de ROR1 mientras control-TCB (triángulos) no indujo ninguna activación de células T. A una concentración clínicamente relevante de 1 nM de ROR1 Mab2-TCBcv, ya había hasta un 40% de células T CD4 activadas y un 25% de células T CD8 activadas después de 48 h de incubación.

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

h): se observó un 30-40% de lisis de células diana con los anticuerpos TCB1+1 y TCB2+1 anti-ROR1/anti-CD3 a una concentración de 100 pM, mientras que los controles TCB no enlazadores no indujeron ninguna lisis tumoral a la misma concentración.

5 Figura 11. Muerte de células T redirigidas de células diana RPMI8226 MM positivas para ROR1 por células T de  
 10 PBMC activadas por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en diferentes proporciones de células efectoras a células  
 tumorales (E:T). La citotoxicidad específica de las células diana (lisis tumoral) inducida por anticuerpos TCB anti-  
 ROR1/anti-CD3 se midió mediante la liberación de LDH. (A) Relación E: T = 10 PBMC: 1 célula RPMI8226 MM  
 (punto de tiempo de 24 h): hubo una respuesta dependiente de la concentración con concentraciones crecientes de  
 hasta 100 nM. Se observó una media máxima del 25% de lisis tumoral con anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 +  
 1 de concentración 100 nM y anti-ROR1/anti-CD3 TCB2 + 1 en condiciones experimentales con una relación E: T de  
 10: 1 es decir 10 PBMC para 1 célula diana RPMI8226. El 25% de lisis tumoral observada a 100 nM detectada por la  
 liberación de LDH no podría atribuirse solo a la destrucción inespecífica de las células diana, ya que solo hubo un  
 9% de lisis inespecífica de células diana con 100 nM de TCB2 + 1 no ligante (es decir, se une a células efectoras  
 15 pero no a las células diana). (B) Relación E: T = 25 PBMC: 1 célula RPMI8226 MM (punto de tiempo de 24 h): hubo  
 una lisis tumoral dependiente de la concentración con concentraciones crecientes de anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1  
 hasta 2 nM. Ya se observó una media máxima del 30% de lisis tumoral con una concentración 2 nM de anti-  
 ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1, pero la lisis tumoral pareció alcanzar una meseta ya que la concentración de 100 nM no  
 se asoció con una respuesta más alta.

20 Figura 12. Muerte de células T redirigidas de células diana de cáncer de ovario positivas para ROR1 con diferente  
 nivel de ROR1 de superficie: alta expresión de PA-1 (A), expresión media de COLO-704 (B) y OVCAR-5 (C), y  
 expresión baja SK-OV-3 (D). Proporciones de células efectoras a células tumorales (E: T) de 10 PBMC: 1 célula  
 25 diana. Se midió la citotoxicidad específica de las células diana (lisis tumoral) inducida por anticuerpos anti-  
 ROR1/anti-CD3 TCB mediante liberación de LDH (cultivo de 48 h). Hubo una respuesta dependiente de la  
 concentración con concentraciones crecientes de 0,5 pM a 50 nM. ROR1 Mab2-TCBcv (cuadrados) indujo un  
 aumento dependiente de la concentración en la lisis de células tumorales de las células de cáncer de ovario PA-1 de  
 alta expresión de ROR1 (A), COLO-704 de medio expresión de ROR1 (B) y las células de cáncer de ovario OVCAR-  
 5 (C) y células de cáncer de ovario SK-OV-3 de baja expresión de ROR1 (D). Por el contrario, el control-TCB (A, B,  
 30 C; círculos) que solo se une a CD3 no indujo la lisis de células tumorales a concentraciones clínicamente relevantes  
 (es decir, hasta 10 nM). Se muestran experimentos representativos (n = 1 a 5).

### **Descripción detallada de la invención**

35 Los inventores han encontrado que los anticuerpos biespecíficos contra CD3 $\epsilon$  y ROR1 con intercambio de VH/VL se  
 pueden producir con alto rendimiento y purificarse fácilmente si en la cadena ligera CL de cualquiera de la porción de  
 anticuerpo contra CD3 $\epsilon$  o ROR1 el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K),  
 arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat), y en el respectivo dominio constante CH1 el aminoácido en la  
 40 posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E), o  
 ácido aspártico (D) (numeración según el índice UE de Kabat).

Preferiblemente, el intercambio de VH/VL se encuentra en la parte de unión a CD3. Preferiblemente, el anticuerpo  
 biespecífico es monovalente para la unión a CD3. Las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente pueden  
 45 estar en la parte de unión a ROR1 o en la parte de unión a CD3. Por tanto, en una determinada realización de  
 la invención, la porción de unión a CD3 puede comprender el intercambio VH/VL y las sustituciones de  
 aminoácidos. En este caso, la porción de unión a ROR1 no comprende ningún intercambio VH/VL o sustituciones de  
 aminoácidos en los aminoácidos 124, 147, 213 o 123. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico es monovalente  
 para la unión a CD3 y bivalente para la unión a ROR1. Como se describe, el anticuerpo biespecífico puede por tanto  
 50 comprender una segunda porción de unión a ROR1, que es idéntica a la primera. Por lo tanto, si la primera porción  
 de unión a ROR1 comprende las sustituciones de aminoácidos, la segunda porción de unión a ROR1 comprende las  
 mismas sustituciones y si la primera porción de unión a ROR1 no comprende las sustituciones de aminoácidos, la  
 segunda porción de unión a ROR1 tampoco comprende las sustituciones. Preferiblemente, el aminoácido 124 es K,  
 el aminoácido 147 es E, el aminoácido 213 es E y el aminoácido 123 es R. Preferiblemente, la parte de unión a CD3  
 55 y la parte de unión a ROR1 (o ambas partes de unión a ROR1 si es así) son fragmentos Fab, por lo que cuando dos  
 porciones de unión de ROR1 están presentes una parte de ROR1 está químicamente unida a la parte de unión de  
 CD3 a través de CH1/VL (extremo C de la parte de unión de ROR1 (CHI) al extremo N de la parte de unión de CD3  
 de entrecruzamiento (VL)) o CH1/VH (C-terminal de la parte de unión de CD3 de entrecruzamiento (CHI) al extremo  
 N-terminal de la parte de unión de ROR1 (VH)). El anticuerpo biespecífico puede comprender o no comprender una  
 60 parte Fc.

El término "ROR1", como se usa en el presente documento, se refiere a ROR1 humano (sinónimos: receptor  
 transmembrana de proteína tirosina quinasa ROR1, EC=2.7.10.1, tirosina quinasa neurotrófica, receptor relacionado  
 1, UniPrKB Q01973) que es un receptor de proteína tirosina quinasa. El dominio extracelular de ROR1 consiste  
 según UniProt en los aminoácidos 30-406. El término "anticuerpo contra ROR1, anticuerpo anti-ROR1 o Mab de  
 65 ROR1" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a ROR1  
 humano. El anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de ROR1 (aminoácidos M1-V406 de la SEQ

ID NO: 1). El anticuerpo se une específicamente a fragmentos del dominio extracelular, que son el dominio de tipo C2 similar a Ig (aminoácidos Q73-V139 de la SEQ ID NO: 1), el dominio Frizzled (aminoácidos E165-I299 de la SEQ ID NO: 1), o el dominio de kringle (aminoácidos K312-C391 de la SEQ ID NO: 1). Estos fragmentos se mencionan en WO2005100605. Se prefiere además que el anticuerpo se una específicamente al fragmento del dominio extracelular WNISSELNKDSYLTL (SEQ ID NO:18) de ROR1. Este fragmento se menciona en Daneshmanesh AH et al., Int. J. Cancer, 123 (2008) 1190-1195. Anticuerpos anti-ROR1 de ejemplo según la invención son Mab2 (WO201209731, Mab 4A5), y Mab1, Mab3 y Mab4 (WO2012075158, Mabs R12, Y31 and R11). Cuando no se especifica, los anticuerpos IgG o TCB ROR1 se refieren a Mab1.

El término "CD3 $\epsilon$  o CD3" como se usa en el presente documento se refiere a CD3 $\epsilon$  humano que se describe en UniProt P07766 (CD3E\_HUMAN). El término "anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo que se une a CD3 $\epsilon$ . Preferiblemente, el anticuerpo comprende un dominio variable VH que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, 13 y 14 que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y un dominio variable VL que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, 16 y 17, como respectivamente, CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo comprende los dominios variables de la SEQ ID NO: 10 (VH) y SEQ ID NO: 11 (VL). Preferiblemente, el anticuerpo comprende un dominio variable VH que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 23, 24 y 25, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y un dominio variable VL que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 26, 27 y 28, que corresponden respectivamente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo comprende los dominios variables de la SEQ ID NO: 21 (VH) y SEQ ID NO: 22 (VL). Los anticuerpos anti-CD3 que se muestran en SEQ ID NO: 10 y 11 y 21 y 22 derivan de SP34 y tienen secuencias similares y las mismas propiedades en lo que respecta a la unión a epítipo que el anticuerpo SP34.

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

Los anticuerpos según la invención se analizan por ELISA para la unión a ROR1 humano usando ROR1 unido a la placa. Para este ensayo, se usa una cantidad de ROR1 unido a placa preferiblemente o 1,5 nM y concentraciones que varían preferiblemente de 1 pM a 200 nM de anticuerpo anti-ROR1. Un anticuerpo según la invención para el que su unión a ROR1 es al menos un 20% superior a los valores de DO de las muestras de control sin ROR1 unido a la placa o con células HEK293 no transfectadas según la invención es un anticuerpo "que se une a ROR1 humano en un ensayo de ELISA". Un anticuerpo de ejemplo según la invención se caracteriza por el conjunto de polipéptidos de cadena ligera y pesada SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40. Otro anticuerpo de ejemplo según la invención se caracteriza por el conjunto de polipéptidos de cadena pesada y ligera SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 41.

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

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

secuencia de SEQ ID NO: 6, en la misma concentración y condiciones experimentales.

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

El término "reducción de la intensidad de fluorescencia media" ( $\Delta$ MFI) que refleja la internalización de dicho anticuerpo anti-ROR1 a las células positivas de ROR1" o "reducción de MFI" como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de la reducción de MFI tal como se calcula para cada anticuerpo de ROR1 en relación al control de IgG humana no específica ( $MFI_{\text{fondo}}$ ) y anticuerpos de ROR1 mantenidos en hielo ( $MFI_{\text{max}}$ ) mediante el uso de la fórmula  $\Delta$ MFI = 100 - 100 X [( $MFI_{\text{experimental}}$  -  $MFI_{\text{fondo}}$ )/( $MFI_{\text{max}}$  -  $MFI_{\text{fondo}}$ )]. Una  $MFI_{\text{experimental}}$  es la MFI medido con dicho anticuerpo de ROR1 después de la incubación de 2 horas a 37 °C. Una reducción de la MFI que es bloqueada e invertida al menos un 75% por el inhibidor de la endocitosis óxido de fenilarsina 10  $\mu$ M es causada por ejemplo por la internalización de anticuerpos, mientras que una reducción de MFI que no es bloqueada por óxido de fenilarsina es causada por la disociación del anticuerpo. La internalización de anticuerpos anti-ROR1 es conocida en el estado de la técnica (Baskar et al, Clin Cancer Res, 14 (2): 396-404 (2008)).

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

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

El término "anticuerpo" como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo consiste en dos pares de una "cadena ligera" (LC) y una "cadena pesada" (HC) (tales pares de cadena ligera (LC)/cadena pesada se abrevian aquí como LC/HC). Las cadenas ligeras y pesadas de tales anticuerpos son polipéptidos que consisten en varios dominios. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3 (clases de anticuerpos IgA, IgD e IgG) y opcionalmente el dominio constante de cadena pesada CH4 (clases de anticuerpos IgE e IgM). Cada cadena ligera comprende un dominio variable VL de cadena ligera y un dominio CL constante de cadena ligera. Los dominios variables VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los "dominios constantes" de la cadena pesada y de la cadena ligera no participan directamente en la unión de un anticuerpo a una diana, pero exhiben varias funciones efectoras.

La "cadena ligera de un anticuerpo" tal como se usa en el presente documento es un polipéptido que comprende en la dirección N-terminal a C-terminal un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio constante de cadena ligera (CL), abreviado como VL- CL. Una "cadena ligera de entrecruzamiento (VH-CL)" como se usa en este documento es una cadena ligera en la que el dominio VL se reemplaza por el dominio VH respectivo. La "cadena pesada de un anticuerpo" como se usa en este documento es un polipéptido que comprende en la dirección N-terminal a C-terminal un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio constante de cadena pesada 1 (CH1). Una "cadena pesada de entrecruzamiento (VL-CH1)", como se usa en el presente documento, es una cadena pesada en la que el dominio VH se reemplaza por el dominio VL respectivo.

Existen varios enfoques para modificaciones de CH3 para hacer cumplir la heterodimerización, que están bien descritos por ejemplo en los documentos WO96/27011, WO98/050431, EP1870459, WO2007/110205, WO2007/147901, WO2009/089004, WO2010/129304, WO2011/90754, WO2011/143545, WO2012058768, WO2013157954, WO2013096291. Por lo general, en todos estos enfoques, el primer dominio CH3 y el segundo dominio CH3 se diseñan ambos de manera complementaria de modo que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) ya no puede homodimerizarse consigo mismo, pero se ve obligado a heterodimerizar con el otro dominio CH3 modificado por ingeniería complementaria (de modo que el primer y segundo dominio CH3 se heterodimerizan y no se forman homodímeros entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3). Estos diferentes enfoques para mejorar la heterodimerización de la cadena pesada se contemplan como diferentes alternativas en combinación con las modificaciones de la cadena pesada-ligera (intercambio/reemplazo de VH y VL en un brazo de unión y la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en la interfaz CH1/CL) en los anticuerpos de acuerdo con la invención que reducen el apareamiento incorrecto de cadenas ligeras, por ejemplo, productos secundarios de tipo Bence-Jones.

La variante de sustitución de aa o carga se aplica al dominio constante CL en las posiciones 123 y 124 y el dominio constante CH1 en las posiciones 147 y 213 en los anticuerpos según la invención que reducen el apareamiento incorrecto de cadena ligera.

5 En una realización preferida de la invención (en caso de que el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende dominios CH3 en las cadenas pesadas) los dominios CH3 de dicho anticuerpo multiespecífico según la invención pueden ser alterados mediante la tecnología "knob into holes" que se describe en detalle con varios ejemplos en, por ejemplo, WO 96/027011, Ridgway, JB, et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y Merchant, AM et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681; WO98/050431. En este procedimiento, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para aumentar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "agujero".

15 Así, en una realización de la invención, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención (comprende un dominio CH3 en cada cadena pesada y) se caracteriza además porque el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada del anticuerpo en a) y el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada del anticuerpo en b) se encuentran cada uno en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 del anticuerpo, en donde dicha interfaz se altera para promover la formación del anticuerpo de acuerdo con la invención, en donde la alteración se caracteriza porque:

20 i) el dominio CH3 de una cadena pesada se altera, de modo que dentro de la interfaz original del dominio CH3 de una cadena pesada que se encuentra con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo según la invención, un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando así una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que se puede colocar en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada y

25 ii) el dominio CH3 de la otra cadena pesada se altera, de modo que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se encuentra con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo de acuerdo con la invención, un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando así una cavidad dentro de la interfaz del segundo dominio CH3 dentro de la cual se puede colocar una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.

Preferiblemente, dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

35 En un aspecto de la invención ambos dominios CH3 se alteran aún más por la introducción de la cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3 de tal manera que se puede formar un puente disulfuro entre los dos dominios CH3.

40 Otras técnicas para modificaciones de CH3 para hacer cumplir la heterodimerización se contemplan como alternativas de la invención y se describen por ejemplo en los documentos WO96/27011, WO98/050431, EP1870459, WO2007/110205, WO2007/147901, WO2009/089004, WO2010/129304, WO2011/90754, WO2011/143545, WO2012/058768, WO2013/157954, WO2013/157953, WO2013/096291.

45 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de isotipo IgG2 y se pueden utilizar alternativamente el enfoque de heterodimerización que se describe en WO2010/129304.

50 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos por ejemplo, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos manipulados genéticamente (anticuerpos variantes o mutantes) siempre que sus propiedades características se conserven. Son especialmente preferidos los anticuerpos humanos o humanizados, especialmente como anticuerpos humanos o humanizados recombinantes. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en este documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de un solo aminoácido.

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

65

Un "fragmento Fab de un anticuerpo" como se usa en el presente documento es un fragmento de un anticuerpo que se une a antígenos. Un fragmento Fab de un anticuerpo consiste en dos pares de dominios. En un anticuerpo de tipo salvaje se compone de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesadas (CH1 y VH) y las cadenas ligeras (CL y VL). Según la invención, tales pares de dominios pueden ser, debido a un entrecruzamiento, también VH-CL y VL-CH1. En un anticuerpo de tipo salvaje y de acuerdo con la invención, el dominio de los pares de dominios de cadena pesada y ligera de un fragmento Fab no está unido químicamente entre sí y, por lo tanto, no son scFv (fragmentos variables de cadena sencilla). "Entrecruzamiento" según la invención significa que preferiblemente en un Fab los dominios VL y VH están reemplazados entre sí. El término "fragmento Fab" también incluye partes o toda la región bisagra, como el fragmento Fab'. Como se usa en este documento, "fragmento F(ab)<sub>2</sub>" se refiere a un fragmento de anticuerpo mono específico bivalente, preferiblemente con una parte Fc.

El término "sustitución de aa o variante de carga" como se usa en este documento significa sustitución de aminoácidos de acuerdo con la invención en que en un dominio constante CL el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y donde en el respectivo dominio constante CH1 el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), y además, en el dominio constante CL en el aminoácido de la posición 123 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) y preferiblemente por arginina (R).

Una combinación preferida de sustitución de aa es Q124K, E123R, K147E y K213E (por ejemplo: E123R significa que el ácido glutámico (E) en la posición 123 se sustituye por arginina (R). Preferiblemente, un fragmento F(ab)<sub>2</sub> está unido en el extremo C-terminal por enlace(s) disulfuro en la región bisagra y normalmente un "fragmento F(ab)<sub>2</sub>" es un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Una combinación preferida de sustitución de aa es E124K, E123K, K147E y K213E (por ejemplo: E123K significa que el ácido glutámico (E) en la posición 123 se reemplaza por lisina (K). Preferiblemente, un fragmento F(ab)<sub>2</sub> está unido en el extremo C-terminal por enlace(s) disulfuro en la región bisagra y normalmente un "fragmento F(ab)<sub>2</sub>" de este tipo es un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. La introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en los dominios constantes CH1/CL de los anticuerpos de acuerdo con la invención reduce el apareamiento incorrecto de cadenas ligeras.

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

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

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



cadena ligera tiene dos dominios sucesivos: un dominio constante CL y uno dominio variable VL. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos.

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

10 Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por el experto en la materia y está definido en base de la escisión por papaína de anticuerpos. Los anticuerpos de acuerdo con la invención, que comprenden una parte Fc, contienen como parte Fc, preferiblemente una parte Fc derivada de origen humano y, preferiblemente, todas las demás partes de las regiones constantes humanas. La parte Fc de un anticuerpo está directamente implicada en la activación del complemento, unión a C1q, activación de C3 y unión al receptor Fc. Mientras que la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento depende de ciertas condiciones, la unión a C1q es causada por los sitios de unión definidos en la parte Fc. Tales sitios de unión son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, por Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, JJ, Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, DR, et al, Nature 288 (1980) 338-344.; Thommesen, JE, et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, EE, et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., y otros, Immunology 86 (1995) 319-324; y EP 0 307 434. Tales sitios de unión son, por ejemplo L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat, ver a continuación). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran la activación del complemento, unión a C1q y la activación de C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento, no se unen a C1q y no activan C3. Preferiblemente, la parte Fc es una parte Fc humana. Preferiblemente, la parte Fc es una parte de IgG1Fc humana. Preferiblemente, el anticuerpo según la invención comprende en la parte Fc de IgG1 humana la sustitución de aminoácidos de Pro329 por glicina o arginina y/o sustituciones L234A y L235A, preferiblemente Pro329 por glicina y sustituciones L234A y L235A.

30 Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende las regiones pesadas constantes CH2/CH3 de IgG1 subclase se caracteriza en que comprende las mutaciones L234A, L235A y P239G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) para evitar FcR y la unión a C1q y la minimización de ADCC /CENTROS PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES. La ventaja es que dicho anticuerpo de la invención media su eficacia de destrucción de células tumorales puramente por el poderoso mecanismo de redirección/activación de células T. Se evitan mecanismos de acción adicionales como los efectos sobre el sistema del complemento y sobre las células efectoras que expresan FcR y se reduce el riesgo de efectos secundarios.

40 Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende como parte Fc una variante de Fc de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje, dicha variante de Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Pro329 y al menos otra sustitución de aminoácidos, en donde los residuos se numeran de acuerdo con el índice EU de Kabat, y en el que dicho anticuerpo muestra una afinidad reducida por el FcγRIIIA y/o FcγRIIA y/o FcγRI humanos en comparación con un anticuerpo que comprende la región Fc de IgG de tipo salvaje, y en el que la ADCC inducida por dicho anticuerpo es reducido a al menos el 20% de la ADCC inducida por el anticuerpo que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje. En una realización específica, la Pro329 de una región Fc humana de tipo salvaje en el anticuerpo de acuerdo con la invención se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande como para destruir el sándwich de prolina dentro de la interfaz del receptor Fc/Fcγ, que se forma entre la prolina329 del Fc y los residuos de triptófano Trp 87 y Tip 110 de FcγRIII (Sondermann et al.: Nature 406, 267-273 (20 de julio de 2000)). En un aspecto adicional de la invención, la al menos una sustitución de aminoácido adicional en la variante Fc es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S y aún en otra realización dicha al menos una sustitución de aminoácido adicional es L234A (indica que la leucina 234 está sustituida por alanina) y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana. Dichas variantes de Fc se describen en detalle en el documento WO2012130831.

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

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

60 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Se prefieren los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente invención son aquellos en los que la región constante se ha modificado o cambiado de la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente en lo que respecta a la unión a C1q y/o la unión al receptor Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos también se

denominan como "anticuerpos intercambiados de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN recombinante y transfección de genes convencionales bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, SL, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 (1984) 6851-6855; patentes de Estados Unidos No. 5.202.238 y 5.204.244.

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

El término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, MA, y van de Winkel, JG, Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes de línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación de la diana (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al, Year Immunol 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom, HR, y Winter, G., J. Mol Biol 227 (1992) 381-388; Marks, JD, et al, J. Mol Biol 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); y Boerner, P., et al, J. Immunol 147 (1991) 86-95). Como ya se mencionó para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano" como se usa en este documento también comprende tales anticuerpos que se modifican en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o unión a FcR, por ejemplo, mediante "cambio de clase", es decir, cambio o mutación de partes Fc (por ejemplo, mutación de IgG1 a IgG4 y/o IgG1/IgG4).

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

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

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión a diana de un anticuerpo" cuando se utilizan en el presente documento se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables para la unión a diana. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "estructurales" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en el presente documento. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden de N- a C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2,

FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada cadena están separadas por dichos aminoácidos estructurales. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión a diana. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5ª ed., Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD (1991).

5 El término "diana" o "molécula diana", tal como se usa en el presente documento, se utilizan de forma intercambiable y se refieren a ROR1 humano y CD3ε humano.

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

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

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

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

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

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

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

55 Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular autoreplicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN, y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción de ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones que se han descrito.

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

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

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

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

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

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

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

Los enlazadores biespecíficos de células T (TCB) tienen una potencia dependiente de concentración/ocupación de receptores celulares tumorales muy elevada en la muerte celular (por ejemplo, CE<sub>50</sub> en ensayos de muerte celular *in vitro* en el rango de submolar a picomolar bajo; Dreier et al. *Int J Cancer* 2002). El enlazador biespecífico de células T (TCB) se administran en dosis mucho más bajas que los anticuerpos mono-específicos convencionales. Por ejemplo, blinatumomab (CD19xCD3) se administra a una dosis intravenosa continua de 5 a 15 µg/m<sup>2</sup>/día (es decir, sólo 0,35-0,105 mg/m<sup>2</sup>/semana) para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda o 60 µg/m<sup>2</sup>/día para el tratamiento de linfoma no de Hodgki, y las concentraciones en suero a estas dosis están en el intervalo de 0,5 a 4 ng/ml (Klinger et al, *Blood* 2012; Topp et al, *J Clin Oncol* 2011; Goebeler et al *Ann Oncol* 2011). Debido a una vida media de eliminación muy corta de la administración clínica de blinatumomab es a través de infusión continua mediante una bomba transportada al cuerpo del paciente. Debido a la vida media de eliminación más prolongada de los anticuerpos de esta invención, se prevé que para un antibiótico de acuerdo con la invención, la administración subcutánea es posible y preferida en el entorno clínico (preferiblemente en el rango de dosis de 0,1 a 10 mg/m<sup>2</sup> una

o dos veces a la semana, preferiblemente dosis incluso más bajas). Incluso a estas bajas concentraciones/dosis/ocupaciones de receptores, TCB puede causar considerables eventos adversos (Klinger et al., Blood 2012). Las propiedades farmacocinéticas mejoradas de los anticuerpos de la invención son una medida para reducir potencialmente los eventos adversos.

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

25 Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede administrarse una vez o dos veces por semana mediante administración sc.

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

30 Un anticuerpo de acuerdo con la invención con bivalencia a ROR1 y monovalencia a CD3 favorece la unión a la diana tumoral ROR1 en las células malignas sobre CD3ε sobre las células T en circulación y evita CD3 sink, aumentando así la exposición al fármaco en el tumor.

35 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

## Listado de secuencias

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
1	Dominio extracelular de ROR1	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELS VSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDPEMNNITSL GQTAEHLCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLS FRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSS TGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIAC ARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSH LSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCRD ECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLP QPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDYR GTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPENLNG GHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACD SKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALFFFCVCR NNQKSSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMNLNAYKPKS KAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMD HAQLVAIKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAELHH PNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLEHFLIMRS PHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGME YLSSHFFVHKDLAARNLIGEQLHVKISDLGLSREIY SADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGFSSDSDIW SFGVVLWEIFSGLQPYYGFSNQEVIEVMVRKRQLP CSEDCPPRMYSMLTECWNEIPSRPRFKDIHVRLRS WEGLSSTSTTPSGGNATTQTTLSASPVSNLNSP RYPNYMFPSPQGITPQGQIAGFIGPPIPQNRFPINGY PIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSA SGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGG MGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTES MISAEL
2	Mab ROR1 VL	ELVLTQSPSVSAAALGSPAKITCTLSSAHKTDIDWY QQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSSS GADRYLIIPSVQADDEADYYCGADYIGGYVFGGGT QLTVTG
3	CDR1L	TLSSAHKTDID
4	CDR2L	GSYTKRP
5	CDR3L	GADYIGGYV
6	Mab ROR1 VH	QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCASGFDFSAYYMS WVRQAPGKGLEWIA TIYPSSGKTYATWVNGRFTI SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADD GALFNIWGPGLVTISS
7	CDR1H	AYYMS
8	CDR2H	TIYPSSGKTYATWVNG
9	CDR3H	DSYADDGALFNI
10	Mab CD3 VH (H2C)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSS
11	Mab CD3 VL (H2C)	QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYP NWWQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGG TKLTVL
12	CDR1H (H2C)	GFTFNKYAMN
13	CDR2H (H2C)	RIRSKYNNYATYYADSVKD
14	CDR3H (H2C)	HGNFGNSYISYWAY
15	CDR1L (H2C)	GSSTGAVTSGYYPN
16	CDR2L (H2C)	GTFKFLAP
17	CDR3L (H2C)	ALWYSNRWV
18	Fragmento extracelular de ROR1	WNISSELNKDSYLTL
19	Enlazador	GGGGSGGGGS
20	Fragmento intracelular de ROR1	KSQKPYKIDSKQAS

ES 2 850 325 T3

21	Mab CD3 VH (CH2527)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGV RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS
22	Mab CD3 VL (CH2527)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYA NWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL
23	CDR1H (CH2527)	TYAMN
24	CDR2H (CH2527)	RIRSKYNNYATYYADSVKGV
25	CDR3H (CH2527)	HGNFNGNSYVSWFAY
26	CDR1L (CH2527)	GSSTGAVTTSNYAN
27	CDR2L (CH2527)	GTNKRAP
28	CDR3L (CH2527)	ALWYSNLWV
29	ROR1 hum IgG1 HC LALA PG	QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCASGDFSAAYMS WVRQAPGKGLEWIATYIPSSGKTTYATWVNGRFTI SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADD GALFNIWGPGLVTISSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
30	ROR1 hum IgG1 LC	MGWSCILFLVATATGVHSELVLTQSPSVSAALGSP AKITCTLSSAHTDTIDWYQQLQGEAPRYLMQVQS DGSYTKRPGVPDRFSGSSGADRYLIIPSVQADDEA DYCYGADYIGGYVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
31	ROR1 x CD3 VH_CL HC knob LALA PG	QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCASGDFSAAYMS WVRQAPGKGLEWIATYIPSSGKTTYATWVNGRFTI SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADD GALFNIWGPGLVTISSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGL EWSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWFA YWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

32	ROR1 HC hole LALA PG	<p>QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMS  WVRQAPGKGLEWIATYIPSSGKTYATWVNGRFTI  SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADD  GALFNIWGPGLVTISSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN  TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPEAAGGPSVFLF  PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY  VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ  VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES  NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ  QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
33	CD3 VL_CH1	<p>QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYA  NWVQEPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG  GKAALTLGAQPEDEAEYCALWYSNLWVFGGVT  KLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV  KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP  KSC</p>
34	ROR1 x CD3 VH_CL	<p>QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMS  WVRQAPGKGLEWIATYIPSSGKTYATWVNGRFTI  SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADD  GALFNIWGPGLVTISSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN  TKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL  VQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGL  EWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT  LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA  YWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  QDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQG  LSSPVTKSFNRGEC</p>
35	(ROR1)x2 x CD3 VH_CL	<p>QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMS  WVRQAPGKGLEWIATYIPSSGKTYATWVNGRFTI  SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADD  GALFNIWGPGLVTISSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN  TKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGRL  VTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMSWVRQAPGKGL  EWIATYIPSSGKTYATWVNGRFTISSDNAQNTVD  LQMNSLTAADRATYFCARDSYADDGALFNIWGP  GLVTISSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV  DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP  KSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS  CAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKY  NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR  AEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLT  VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  SSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  NRGEC</p>
36	Fc hole LALA PG	<p>MGWSCIIIFLVATATGVHSDKHTHTCPPAPEAAG  GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE  VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  LTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK  GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS  DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL  TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  PGK</p>



ES 2 850 325 T3

37	ROR1 VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc knob LALA PG	QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFAAYMS WVRQAPGKGLEWIATIPSSGKTYATWVNGRFTI SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADD GALFNIWGPGLVTVISSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSAVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQA FRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGA QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK
38	ROR1cv HC hole LALA PG	QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFAAYMS WVRQAPGKGLEWIATIPSSGKTYATWVNGRFTI SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADD GALFNIWGPGLVTVISSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
39	CD3 VH_CL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKQ RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNFPYFPAKVVQWVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
40	ROR1cv hum IgG1 LC lambda	ELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTDIDWY QQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSS GADRYLIIPSVQADDEADYFCGADYIGGYVFGGGT QLTVLGGPKAAPSVTLFPPSSKKLQANKATLVCLIS DFYFGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
41	ROR1cv hum IgG1 LC kappa	ELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTDIDWY QQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSS GADRYLIIPSVQADDEADYFCGADYIGGYVFGGGT QLTVTRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLN FYPREKVVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
42	Mab2 ROR1 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMS WVRQIPEKRLEWVASISRGGTTYYPDSVKGRFTISR DNVRNILYLQMSLRSEDTAMYCCGRYDYGYYA MDYWGQGTSTVTVSS
43	Mab3 ROR1 VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLNSHWMSW VRQAPGKGLEWIGIIAASGSTYYANWAKGRFTISK TSTTVDLRIASPTTEDTATYFCARDYGDYRLVTFNI WGPGLVTVSS

ES 2 850 325 T3

44	Mab4 ROR1 VH	QSVKESEGDLVTPAGNLTCTASGSDINDYPISWV RQAPGKGLEWIGFINSGGSTWYASWVKGRFTISRT STTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYSTYYCDFNIW GPGTLVTISS
45	Mab2 ROR1 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWF QQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGGGSGQDY SLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPHYTFGGGTKLEM K
46	Mab3 ROR1 VL	ELVMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQASQSIGSYLAW YQQKPGQPPKLLIYYASNLAGVPSRFSGSGSGETEY TLTISGVQREDAATYYCLGSLSNSDNVFGGGTELEI L
47	Mab4 ROR1 VL	ELVMTQTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAW FQQKPGQPPTLLIYRASNLAGVPSRFSGSRSGTEY TLTISGVQREDAATYYCLGGVGNVSYRTSFGGGTE VVVK
48	Mab2 ROR1 CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
49	Mab3 ROR1 CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
50	Mab4 ROR1 CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
51	Mab2 ROR1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
52	Mab3 ROR1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
53	Mab4 ROR1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
54	Mab2 knob HC	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMS WVRQIPEKRLWVASISRGGTTYYPDSVKGRFTISR DNVRNILYLQMSSLRSEDAMYYCGRYDYDGYA MDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTV SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAF RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

55	Mab2 hole HC	<p>EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMS  WVRQIPEKRLEWVASISRGGTTYYPDSVKGRFTISR  DNVRNILYLQMSLRSEDTAMYCCGRYDYGYYA  MDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  KVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV  CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ  GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
56	Mab2 ROR1 LC	<p>DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDISYLSWF  QQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSPRFSGGGSGQDY  SLTINSLEYEDMGIIYCLQYDEFPTYFGGGTKLEM  KRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPR  EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS  STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  GEC</p>
57	Mab3 ROR1 knob HC	<p>QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLNSHWMSW  VRQAPGKGLEWIGIIAASGSTYYANWAKGRFTISK  TSTTVDLRIASPTTEDTATYFCARDYGDYRLVTFNI  WPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL  GCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDE  KVEPKSCDGGGGGGGGGSAVVTQEPSTVSPGGT  VLTTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGG  TNKRAPGTPARFSGLLGGKAALTLGAQPEDEAE  YYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPL  APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC  NVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA  GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA  KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY  SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL  TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS  PGK</p>
58	Mab3 ROR1 hole HC	<p>QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLNSHWMSW  VRQAPGKGLEWIGIIAASGSTYYANWAKGRFTISK  TSTTVDLRIASPTTEDTATYFCARDYGDYRLVTFNI  WPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL  GCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDE  KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD  TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP  SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF  SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
59	Mab3 ROR1 LC	<p>ELVMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQASQSIGSYLAW  YQQKPGQPPKLLIYYASNLASGVPSRFSGGSGTEY  TLTISGVQREDAATYYCLGSLNSDNVFGGGTELEI  LRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPR  EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS  STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  GEC</p>

60	Mab4 ROR1 knob HC	QSVKESEGDLVTPAGNLTCTASGSDINDYPISWV RQAPGKGLEWIGFINSGGSTWYASWVKGRFTISRT STTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYSTYYCDFNIW GPGTLVTISSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDEKV EPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTVT LTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGKTLTVLSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYLSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
61	Mab4 ROR1 hole HC	QSVKESEGDLVTPAGNLTCTASGSDINDYPISWV RQAPGKGLEWIGFINSGGSTWYASWVKGRFTISRT STTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYSTYYCDFNIW GPGTLVTISSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDEKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
62	Mab4 ROR1 LC	ELVMTQTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAW FQQKPGQPPTLLIYRASNLAGVPSRFSRSGTEY TLTISGVQREDAATYYCLGGVGNVSYRTSFGGGTE VVVKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTY SLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

Para producir los siguientes TCB anti-ROR1/anti-CD3 que contienen Fc de acuerdo con la invención, las respectivas construcciones/ID de secuencia como se menciona en la tabla anterior son necesarios:

ROR1-TCB (2 + 1): 37, 38, 39, 40 x2 o 37, 38, 39, 41 x2

5 ROR1-TCB (1 + 1): 36, 37, 39, 40 o 36, 37, 39, 41

Mab2 ROR1-TCB (2 + 1): 39, 54, 55, 56 x2

Mab3 ROR1-TCB (2 + 1): 39, 57, 58, 59 x2

Mab4 ROR1-TCB (2 + 1): 39, 60, 61, 62 x2

10 **Materiales y procedimientos generales**

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

20 ***Técnicas de ADN recombinante***

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

91-3242. Los aminoácidos y cadenas de anticuerpos se enumeraron y se refirieron según Kabat E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed, Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD (1991).

## 5 **Síntesis de genes**

a) Los segmentos del gen deseado se preparan a partir de oligonucleótidos fabricados mediante síntesis química. Los segmentos de genes de 600-1800 pb de longitud, que están flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singulares, se ensamblan por hibridación y ligamiento de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR y posteriormente se clonaron a través de los sitios de restricción indicados, por ejemplo, KpnI/Sad o AsclI/Pacl en un vector de clonación pGA4 a base de pPCRScript (Stratagene). Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirman por secuenciación del ADN. Los fragmentos de la síntesis de genes se ordenan de acuerdo con las especificaciones dadas en Geneart (Regensburg, Alemania). b) Los segmentos del gen deseado, cuando fue necesario, se generaron por PCR usando plantillas apropiadas o fueron sintetizados por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de la PCR mediante síntesis automatizada de genes. Los segmentos de genes flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singulares se clonaron en vectores de expresión estándar o en vectores de secuenciación para su posterior análisis. El ADN plásmido se purificó a partir de bacterias transformadas utilizando kits de purificación de plásmidos disponibles comercialmente. La concentración de plásmido se determinó por espectroscopia UV. La secuencia de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmó por secuenciación de ADN. Los segmentos de genes fueron diseñados con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Si es necesario, los genes de codificación de proteínas se diseñaron con una secuencia de ADN de extremo 5' para un péptido líder que reconoce proteínas para la secreción en células eucariotas.

25

### **Determinación de la secuencia de ADN**

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

## 30 **Análisis de la secuencia de ADN y proteína y gestión de datos de la secuencia**

Se utilizó el paquete de software Clone Manager (Software Científico y Educativo) versión 9.2 para el mapeo, análisis, anotación y la ilustración de secuencias.

## 35 **Vectores de expresión**

a) Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpos descritas como se describe a continuación se generaron mediante PCR y/o síntesis de genes y se ensamblaron con procedimientos y técnicas recombinantes conocidas mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, utilizando sitios de restricción únicos en los vectores respectivos. Las secuencias de ácido nucleico subclonadas se verificaron mediante secuenciación de ADN. Para transfecciones transitorias, se preparan cantidades mayores de plásmidos mediante preparación de plásmidos a partir de cultivos de E. coli transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel). b) Para la generación de vectores de expresión de anticuerpo anti-ROR1, las regiones variables de las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera se subclonaron en el marco con la cadena pesada constante de IgG1 humana o la cadena ligera constante de IgG1 humana preinsertadas en el respectivo vector de expresión receptor genérico optimizado para la expresión en líneas celulares de mamíferos. La expresión del anticuerpo es impulsada por un promotor de MPSV quimérico que comprende un promotor de CMV y un promotor de MPSV seguido de una UTR 5', un intrón y un elemento MAR kappa Ig. La transcripción se termina mediante una secuencia señal sintética poliA en el extremo 3' de los CDS. Todos los vectores llevan una secuencia de ADN de extremo 5' que codifica un péptido líder que reconoce proteínas para la secreción en células eucariotas. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de EBV para la replicación del plásmido episomal en células que expresan EBNA de EBV. c) Para la generación de vectores de anticuerpos biespecíficos ROR1xCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos en dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y ROR1. Los restos de unión al antígeno son fragmentos Fab compuestos por una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales comprende una región variable y una constante. Al menos uno de los fragmentos Fab era un fragmento "Crossfab", en el que se intercambiaban VH y VL. El intercambio de VH y VL dentro del fragmento Fab asegura que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tengan disposiciones de dominio idénticas. El diseño de la molécula biespecífica fue monovalente para CD3 y bivalente para ROR1, donde un fragmento Fab se fusionó con el extremo N del CrossFab interno (2 + 1). La molécula biespecífica contenía una parte Fc para que la molécula tuviera una vida media prolongada. En la Figura 1 se da una representación esquemática de las construcciones; las secuencias preferidas de las construcciones se muestran en las SEQ ID NO 39 a 52. Las moléculas se produjeron mediante la cotransfección de células HEK293 EBNA basadas en polímeros que crecían en suspensión con los vectores de expresión de mamíferos. Para la preparación de construcciones 2 + 1 CrossFab-IgG, las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:2:1:1 ("vector Fc (botón)": "cadena ligera del vector": "cadena pesada del vector CrossFab" : "vector de cadena pesada-CrossFab").

65

**Técnicas de cultivo celular**

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

**Expresión transitoria en células HEK293 (sistema HEK293-EBNA)**

Los anticuerpos biespecíficos se expresaron por cotransfección transitoria de los respectivos vectores de mamífero de expresión en células HEK293-EBNA, que se cultivaron en suspensión, usando un polímero. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se sembraron a 1,5 células viables Mio/ml en medio Ex-Cell, suplementado con 6 mM de L-glutamina. Por cada ml de volumen de producción final, se centrifugaron 2,0 células viables Mio (5 minutos a 210 xg). Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de medio CD CHO. El ADN para cada ml de volumen de producción final se preparó mezclando 1 µg de ADN (Relación cadena pesada: cadena pesada modificada: cadena ligera: cadena ligera modificada = 1:1: 2:1) en 100 µL de medio CD CHO. Después de la adición de 0,27 µl de solución de polímero (1 mg/ml), la mezcla se agitó con vórtex durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de 10 minutos, las células resuspendidas y la mezcla de ADN/polímero se juntaron y a continuación se transfirieron a un recipiente apropiado que se colocó en un dispositivo de agitación (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Después de un tiempo de incubación de 3 horas, se añadieron 800 µl de medio Ex-Cell, suplementado con L-glutamina 6 mM, ácido valproico 1,25 mM y Pepsoy al 12,5% (50 g/L) por cada ml de volumen de producción final. Después de 24 horas, se agregaron 70 µL de solución de alimentación por cada ml de volumen de producción final. Después de 7 días o cuando la viabilidad celular era igual o inferior al 70%, las células se separaron del sobrenadante mediante centrifugación y filtración estéril. Los anticuerpos se purificaron mediante una etapa de afinidad y una o dos etapas de pulido, siendo cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Cuando fue necesario, se utilizó una etapa de pulido adicional. El anticuerpo humano anti-BCMA recombinante y los anticuerpos biespecíficos se produjeron en suspensión mediante la cotransfección de células HEK293-EBNA basadas en polímero con los vectores de expresión de mamíferos. Las células se transfectaron con dos o cuatro vectores, según el formato. Para la IgG1 humana, un plásmido codificó la cadena pesada y el otro plásmido la cadena ligera. Para los anticuerpos biespecíficos, se cotransfectaron cuatro plásmidos. Dos de ellos codificaron las dos cadenas pesadas diferentes y los otros dos codificaron las dos cadenas ligeras diferentes. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se sembraron a 1,5 células viables Mio/ml en medio F17, complementado con 6 mM de L-glutamina.

**Determinación de proteínas**

La determinación de la concentración de anticuerpo se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm, usando el valor teórico de la absorbancia de una solución al 0,1% del anticuerpo. Este valor se basó en la secuencia de aminoácidos y se calculó mediante el software GPMW (datos de Lighthouse).

**SDS-PAGE**

Se utiliza el sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se utilizan geles prefabricados NuPAGE® Novex® Bis-TRIS al 10% o 4-12% (pH 6,4) y un NuPAGE® MES (geles reducidos, con aditivo de tampón de funcionamiento NuPAGE® Antioxidant) o tampón de ejecución MOPS (geles no reducidos).

**Purificación de proteínas***Por cromatografía de afinidad de proteína A*

Para la etapa de afinidad se cargó el sobrenadante en una columna de proteína A (Protein A HiTrap FF, 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 6 CV 20 mM de fosfato de sodio, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Después de una etapa de lavado con el mismo tampón, el anticuerpo se eluyó de la columna por etapa de elución con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. Las fracciones con el anticuerpo deseado se neutralizaron inmediatamente con fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0 (1:10), se agruparon y se concentraron por centrifugación. El concentrado se filtró en condiciones estériles y se procesó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

*Por cromatografía de intercambio catiónico*

Para la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, la proteína concentrada se diluyó 1:10 con el tampón de elución utilizado para la etapa de afinidad y se cargó en una columna de intercambio catiónico (Poros 50 HS Applied Biosystems). Después de dos etapas de lavado con el tampón de equilibrio y un tampón de lavado resp. fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, pH 5,0 y fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM pH 5,0, la proteína se eluyó con un gradiente usando fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 8,5. Las fracciones que contenían el anticuerpo

deseado se agruparon, se concentraron por centrifugación, se esterilizaron por filtración y se procesaron adicionalmente en una etapa de exclusión por tamaño.

#### Por cromatografía analítica de exclusión por tamaño

Para la etapa de exclusión por tamaño la proteína concentrada se inyectó en una columna HiLoad Superdex XK16/60 200 (GE Healthcare), e histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0 con o sin Tween 20 como tampón de formulación. Las fracciones que contenían los monómeros se agruparon, se concentraron por centrifugación y se esterilizaron por filtración en un vial esterilizado.

#### Medición de pureza y contenido de monómeros.

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

#### Confirmación del peso molecular mediante análisis LC-MS

##### Desglucosilación

Para confirmar la preparación homogénea de las moléculas, la solución de proteína final se analizó por análisis LC-MS. Para eliminar la heterogeneidad introducida por los carbohidratos, las construcciones se tratan con PNGaseF (ProZyme). Por tanto, el pH de la solución de proteína se ajustó a pH 7,0 añadiendo 2 µl de Tris 2 M a 20 µg de proteína con una concentración de 0,5 mg/ml. Se añadieron 0,8 µg de PNGasaF y se incubaron durante 12 ha 37°C.

##### Análisis LC-MS - Detección en línea

El procedimiento LC-MS se realizó en un Agilent HPLC 1200 acoplado a un espectrómetro de masas TOF 6441 (Agilent). La separación cromatográfica se realizó en una columna Macherey Nagel Polysterene; RP1000-8 (tamaño de partícula de 8 µm, 4,6 x 250 mm; nº de catálogo 719510). El eluyente A era acetonitrilo al 5% y ácido fórmico al 0,05% (v/v) en agua, el eluyente B era acetonitrilo al 95%, agua al 5% y ácido fórmico al 0,05%. El caudal fue de 1 ml/min, la separación se realizó a 40 °C y 6 µg (15 µl) de una muestra de proteína obtenida con un tratamiento como se describió anteriormente (tabla 7).

Tabla 7

Tiempo (min)	% B
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Durante los primeros 4 minutos, el eluido se dirigió al residuo para proteger el espectrómetro de masas de la contaminación por sales. La fuente de ESI estaba funcionando con un flujo de gas de secado de 12 l/min, una temperatura de 350 °C y una presión del nebulizador de 60 psi. Los espectros de MS se adquirieron usando un voltaje de fragmentador de 380 V y un rango de masas de 700 a 3200 m/z en modo de iones positivos. Los datos de MS fueron adquiridos por el software del instrumento de 4 a 17 minutos.

#### Aislamiento de células T pan humanas primarias de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se prepararon mediante centrifugación de densidad Histopaque a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidos ("buffy coats") obtenidos a partir de bancos de sangre locales o a partir de sangre fresca de donantes humanos sanos. Brevemente, la sangre se diluyó con PBS estéril y se colocó cuidadosamente en capas sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, H8889). Después de centrifugación durante 30 minutos a 450 xg a temperatura ambiente (freno apagado), se descartó parte del plasma por encima de la interfase que contenía PBMC. Las PBMC se transfirieron a nuevos tubos Falcon de 50 ml y los tubos se llenaron con PBS hasta un volumen total de 50 ml. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 400 xg (freno activado). Se descartó el sobrenadante y el sedimento de PBMC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 350 xg). La población PBMC resultante se cuenta

automáticamente (ViCell) y se almacena en un medio RPMI1640, que contiene 10% de FCS y 1% de L-alanil-L-glutamina (Biochrom, K0302) a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> en la incubadora hasta el inicio del ensayo.

5 El enriquecimiento de células T a partir de PBMC se realizó utilizando el kit II de aislamiento de células Pan T (Miltenyi Biotec n° 130-091-156), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, los sedimentos celulares se diluyeron en 40 µl de tampón frío por 10 millones de células (PBS con BSA al 0,5%, EDTA 2 mM, filtrado estéril) y se incubaron con 10 µl de cóctel de biotina-anticuerpo por 10 millones de células durante 10 min a 4 °C. Se añadieron 30 µl de tampón frío y 20 µl de perlas magnéticas anti-biotina por 10 millones de células, y la mezcla se incubó durante otros 15 min a 4°C. Las células se lavaron añadiendo 10-20x el volumen actual y una etapa de centrifugación posterior a 300 xg durante 10 min. Se resuspendieron hasta 100 millones de células en 500 µl de tampón. La separación magnética de células pan T humanas no marcadas se realizó usando columnas LS (Miltenyi Biotec # 130-042-401) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de células T resultante fue contada automáticamente (ViCell) y se almacenó en medio AIM-V a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> en la incubadora hasta el inicio del ensayo (no más de 24 h).

15

#### ***Aislamiento de células T humanas primarias sin tratar de PBMC***

Se prepararon células de la sangre mononuclear periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidos ("buffy coats") obtenidos a partir de bancos de sangre locales o a partir de sangre fresca de donantes humanos sanos. El enriquecimiento de células T a partir de PBMC se realizó utilizando el kit de aislamiento de células T CD8<sup>+</sup> Naive de Miltenyi Biotec (# 130-093-244), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero omitiendo el último paso de aislamiento de células T CD8<sup>+</sup> (ver también la descripción para el aislamiento de células T pan humanas primarias).

20

25 Nota: todos los experimentos que muestran las propiedades de los anticuerpos biespecíficos se realizaron con los anticuerpos biespecíficos no CV. Sin embargo, según el conocimiento de los inventores, los resultados para los anticuerpos biespecíficos CV según la invención son iguales o sustancialmente similares.

#### **Ejemplos**

30

Observación: si no se menciona que se utilizó Mab2 como anticuerpo anti-ROR1 y/o como Fab anti-ROR1 en un anticuerpo TCB anti-ROR1/anti-CD3 en las siguientes descripciones de los ejemplos, a continuación, Mab 1 se utilizó como anticuerpo anti-ROR1 y/o como Fab anti-ROR1 en un anticuerpo TCB anti-ROR1/anti-CD3.

#### **Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-ROR1**

35

Las secuencias de proteínas de las regiones VH y VL de un anticuerpo ROR1 de SEQ ID NOs: 2-9 (mAb1) se describen en WO2012/075158. Brevemente, los oligonucleótidos que codifican las secuencias anteriores se unen mediante PCR para sintetizar los ADNc que codifican VH son secuencias VL, respectivamente, del anticuerpo anti-ROR1.

40

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

50

Los anticuerpos ROR1 se expresaron por transitoria a base de polímero co-transfección de los respectivos vectores de expresión de mamífero en células HEK293-EBNA, que se cultivan en suspensión. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se sembraron a 1,5 millones de células viables/ml en medio Ex-Cell, suplementado con 6 mM de L-glutamina. Por cada ml de volumen de producción final, se centrifugaron 2,0 millones de células viables (5 minutos a 210 xg). Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de medio CD CHO. El ADN para cada ml de volumen de producción final se preparó mezclando 1 µg de ADN (Relación cadena pesada: cadena ligera = 1: 1) en 100 µL de medio CD CHO. Después de la adición de 0,27 µl de solución de polímero (1 mg/ml), la mezcla se agitó con vórtex durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de 10 minutos, las células resuspendidas y la mezcla de ADN/polímero se juntaron y luego se transfirieron a un recipiente apropiado que se colocó en un dispositivo de agitación (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Después de un tiempo de incubación de 3 horas, se añadieron 800 µl de medio Ex-Cell, suplementado con L-glutamina 6 mM, ácido valproico 1,25 mM y Pepsoy al 12,5% (50 g/L) por cada ml de volumen de producción final. Después de 24 horas, se agregaron 70 µL de solución de alimentación por cada ml de volumen de producción final. Después de 7 días o cuando la viabilidad celular era igual o inferior al 70%, las células se separaron del sobrenadante mediante centrifugación y filtración estéril. Los anticuerpos se purificaron mediante una etapa de afinidad y una o dos etapas

65



de pulido, siendo cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Cuando fue necesario, se utilizó un paso de pulido adicional. Los anticuerpos humanos anti-ROR1 recombinantes se produjeron en suspensión mediante la cotransfección de células HEK293-EBNA basadas en polímeros con los vectores de expresión de mamíferos. Las células se transfectaron con dos vectores. Para la IgG1 humana, un plásmido codificaba la cadena pesada y el otro plásmido la cadena ligera. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se sembraron a 1,5 millones de células viables/ml en medio F17, suplementado con 6 mM de L-glutamina.

## **Ejemplo 2 - Línea celular B-CLL humana o células B-CLL primarias, línea celular de mieloma múltiple o línea celular de linfoma de células del manto que expresan ROR1 en su superficie**

A) Se aislaron células B-CLL primarias humanas frescas (CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>) de la sangre de pacientes con CLL. La sangre se extrae de los pacientes con CLL después de que se otorga el consentimiento informado, de acuerdo con las pautas del comité de ética local y la Declaración de Helsinki. Las células B-CLL primarias humanas criopreservadas (CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>) se adquirieron de Allcells (Alameda, CA, EE.UU.). Las células B-CLL primarias de pacientes se obtuvieron legalmente y cumplen con los requisitos éticos: (i) la obtención de muestras de pacientes diagnosticados con CLL está aprobada por una Junta de Revisión del Instituto (IRB) o un Comité de Sujetos Humanos; (ii) se obtiene del paciente un formulario de consentimiento informado firmado y presenciado antes de participar en el Programa de células enfermas de Allcells; (iii) todos los pacientes diagnosticados con las enfermedades antes mencionadas son compensados razonablemente por su compromiso con el programa y la compensación es aprobada por el IRB o el Comité de Sujetos Humanos; (iv) todos los pacientes son conscientes de que las muestras donadas pueden utilizarse para cualquier aplicación de investigación y renuncian a cualquier derecho generado por las aplicaciones de investigación. Se cultivaron células B-CLL primarias en RPMI complementado con suero bovino fetal al 10%. La expresión de ROR1 en células CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> B-CLL primarias se confirmó mediante citometría de flujo usando anticuerpos anti-ROR1 humanos conjugados con fluorocromo (véase el Ejemplo 3).

b) La línea celular de mieloma múltiple de linfocitos B humanos RPMI8226 se adquirió de ATCC (ATCC CCL-155). Se cultivaron células de mieloma RPMI8226 en DMEM, FCS al 10%, glutamina al 1%. La expresión de ROR1 en líneas celulares RPMI8226 se confirmó mediante citometría de flujo usando anticuerpos anti-ROR1 humanos conjugados con fluorocromo (véase el Ejemplo 3).

c) Linfoma de células del manto humano (linfoma de células B no Hodgkin) La línea de células Rec-1 se adquirió de ATCC (ATCC CRL-3004). Las células Rec-1 se cultivaron en DMEM, FCS al 10%, glutamina al 1%. La expresión de ROR1 en las líneas celulares Rec-1 se confirmó mediante citometría de flujo usando anticuerpos anti-ROR1 humanos conjugados con fluorocromo (véase el Ejemplo 3).

### **Ejemplo 2.1 - Líneas celulares de cáncer de ovario humano con diferentes niveles de expresión de ROR1 en la superficie celular**

a) La línea celular de cáncer de ovario humano PA-1 derivada de teratocarcinoma de ovario se adquirió de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Cat. No. CRL-1572). Las líneas celulares PA-1 se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) (ATCC, Cat. No. 30-2003) suplementado con suero bovino fetal al 10% (inactivado por calor), L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, y 1500 mg/L de bicarbonato de sodio. Se confirmó que la expresión de ROR1 era alta en las líneas celulares PA-1 según se midió mediante citometría de flujo (véase el Ejemplo 3.1).

b) La línea celular de cáncer de ovario humano COLO-704 derivada de adenocarcinoma de ovario se obtuvo del Instituto Leibniz DSMZ - Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ; Cat. No. ACC 198). Se cultivaron líneas celulares COLO-704 en 90% de RPMI 1640 y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. Se confirmó que la expresión de ROR1 era media en las líneas celulares COLO-704 según se midió mediante citometría de flujo (ver Ejemplo 3.1).

c) La línea celular de cáncer de ovario humano ES-2 derivada de carcinoma de células claras de ovario se adquirió de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Cat. No. CRL-1978). Las líneas celulares ES-2 se cultivaron en McCoy 5a Medio Modificado formulado por ATCC (nº de cat. 30-2007) y suero bovino fetal al 10%. Se confirmó que la expresión de ROR1 era negativa en las líneas celulares ES-1 según se midió mediante citometría de flujo (véase el Ejemplo 3.1).

d) La línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3 derivada de carcinoma de ovario se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC; Cat. No. HTB-77). Las líneas celulares SK-OV-3 se cultivaron en medio McCoy 5a modificado con ATCC (nº de cat. 30-2007) y suero bovino fetal al 10%. Se confirmó que la expresión de ROR1 era baja en las líneas celulares SK-OV-3 según se midió mediante citometría de flujo (véase el Ejemplo 3.1).

e) La línea celular de cáncer de ovario humano OVCAR-5 derivada de adenocarcinoma de ovario se obtuvo del panel de líneas celulares de cáncer humano NCI-60 del Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. Se cultivaron líneas celulares OVCAR-5 en 90% de RPMI 1640 y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. Se confirmó que la expresión de ROR1 era media en las líneas celulares OVCAR-5 según se midió mediante citometría de flujo (véase el Ejemplo 3.1).

### **Ejemplo 3 - Unión a ROR1 expresada en células B-CLL primarias, células de mieloma RPMI8226 o células Rec-1 MCL (citometría de flujo)**

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

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

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

	Anticuerpo anti-ROR1
CE50 (nM)	0,087
CE50 (µg/ml)	0,013

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

**Ejemplo 3.1 - Unión de anticuerpos IgG de ROR1 a líneas celulares de cáncer de ovario humano positivas a ROR1 (detectado por citometría de flujo)**

A) El nivel de expresión de ROR1 se midió en líneas celulares de cáncer de ovario humano mediante citometría de flujo que incluye PA-1, COLO-704, ES-2, SK-OV-3 y OVCAR-5. Brevemente, las células se recolectaron, lavaron, contaron para determinar su viabilidad, se resuspendieron a 50.000 células/pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos y se incubaron con anticuerpo anti ROR1 humano marcado con Alexa488 durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos de control de isotipo y ROR1 se valoraron y analizaron en un intervalo de concentración final entre 0,01 - 100 nM (0,0015 - 15 µg/ml). Para las muestras que utilizan anticuerpos no marcados, las células se centrifugaron (5 min, 350 xg), se lavaron con 120 µl/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min más a 4 °C con AlexaFluor conjugado con fluorocromo. Fragmento AffiniPure F (ab ' ) 2 conjugado con 647 anti-IgG humana Fc de cabra específico (Jackson Immuno Research Lab; # 109-606-008). Al final del tiempo de incubación, las células se centrifugaron (5 min a 350 xg), se lavaron dos veces con tampón FACS, se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS y se analizaron en un dispositivo Cantoll con software FACS Diva. A continuación, se cuantificó la expresión de ROR1 como la intensidad de fluorescencia media (MFI) y se trazaron gráficos que mostraban la MFI en función de las concentraciones de anticuerpo ROR1. A continuación, se midieron los valores de CE50 utilizando el software Prism (GraphPad). La Tabla 2 muestra la CE50 de unión de anticuerpos anti-ROR1 de Mab1 y Mab2 a líneas celulares de cáncer de ovario SK-OV-3 y PA-1 positivas para ROR1. Tanto los anticuerpos anti-ROR1 de Mab1 como de Mab2 se unen con más potencia a las líneas celulares PA-1 (que más tarde se descubrió que expresaban un alto nivel de ROR1) que SK-OV-3 (que más tarde se descubrió que expresaban un nivel bajo de ROR1). La SEC50 calculadas para la unión de ROR1 Mab1 y ROR1 Mab2 a SK-OV-3 son valores extrapolados y pueden sobreestimarse o subestimarse. La Figura 3-3 muestra un aumento de MFI en células SK-OV-3 (A, cuadrados abiertos) y células PA-1 (B, triángulos abiertos) en función de las concentraciones de ROR1 Mab2 IgG. La intensidad máxima podría alcanzarse aproximadamente 3 veces más en las células PA-1 frente a las células SK-OV-3 con una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml.

**Tabla 2:** Valores de CE50 para la unión de anticuerpos anti-ROR1 a líneas celulares de cáncer de ovario

Líneas celulares de cáncer de ovario	CE50 de unión	
	ROR1 Mab1	ROR1 MAb2
SK-OV-3	~ 4,62 nM/0,69 µg/ml	~ 357,6 nM/53,37 µg/ml
PA-1	0,87 nM/0,13 µg/ml	0,64 nM/0,095 µg/ml

b) Para determinar el número de copias del antígeno ROR1 en la superficie celular de las células de cáncer de ovario humano PA-1, COLO-704, ES-2, SK-OV-3 y OVCAR-5, se utilizó el procedimiento Qifikit (Dako # K0078). Las células tumorales de ovario se lavaron una vez con tampón FACS (100 µl/pocillo; 350 xg durante 5 min) y se ajustaron a 1 millón de células/ml. Se transfirieron 50 µl (= 0,5 millones de células) de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo, como se indica. Luego, 50 µl de anticuerpo IgG anti-ROR1 humano de ratón (Biolegend # 357802) o un anticuerpo de control de isotipo IgG2a de ratón (BioLegend # 401501)

diluido en tampón FACS (PBS, BSA al 0,1%) hasta una concentración final de 25 µg/ml (o en concentraciones de saturación) y se realizó la tinción durante 30 min a 4 ° C en la oscuridad. A continuación, se añadieron 100 µl de las perlas de preparación o calibración en pocillos separados y las células, así como las perlas, se lavaron dos veces con tampón FACS. Las células y perlas se resuspendieron en 25 µl de tampón FACS, que contenía anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína (a concentraciones de saturación), proporcionado con el Qifikit. Las células y perlas se tiñeron durante 45 min a 4 ° C en la oscuridad. Las células se lavaron una vez y todas las muestras se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo multicolor y se instaló un software (por ejemplo, un dispositivo Cantoll que ejecutaba el software FACS Diva).

Como se muestra en la Tabla 2.1, el número de copias de antígeno/sitios de unión ROR1 se midieron en cinco líneas humanas de ovario de células de cáncer (ES-2, SK-OV-3, OVCAR-5, COLO-704 y PA-1) y se expresó a diferentes niveles. Las células ES-2 no expresaron ninguna copia de antígeno de ROR1 humano mientras que las células S-KOV-3 expresaron un nivel bajo de ROR1 humano, las células OVCAR-5 y COLO-704 expresaron un nivel medio de ROR1 humano y las células PA-1 expresaron un nivel alto de humano ROR1. A la luz de estos resultados de expresión de ROR1, se seleccionarán líneas celulares de cáncer de ovario humano con nivel de expresión alto, medio y/o bajo de ROR1 y se usarán en el ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas como células diana tumorales en el Ejemplo 10.

**Tabla 2.1:** Número de copias/sitios de unión del antígeno de ROR1 en líneas celulares de cáncer de ovario humano medido por citometría de flujo cuantitativa

Líneas celulares de cáncer de ovario humano	Número de copias/sitios de unión del antígeno de ROR1	Nivel de expresión de ROR1
ES-2	0	Negativo
SK-OV-3	3210	Bajo
OVCAR-5	5034	Medio
Colo704	6409	Medio
PA-1	14106	Elevado

**Ejemplo 4. Internalización de anticuerpo anti-ROR1 en PBMC primarias de pacientes con CLL o células MM de RPMI8226 (citometría de flujo)**

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

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

Para las terapias basadas en anticuerpos, tales como biespecíficos de células T, es importante que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para la diana tumoral no internalice, o se internalice lentamente, o se internalice ligeramente para facilitar una sinapsis inmune estable entre la célula tumoral y la célula T y una citotoxicidad redirigida mediante por células T efectiva. Por lo tanto, los anticuerpos anti-ROR1 que no se internalizan o se internalizan lentamente o se internalizan ligeramente se seleccionan para la siguiente etapa (Ejemplo 5) a continuación, a saber, la producción de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3.

Los valores de internalización de anticuerpo IgG anti-ROR1 en células de LLC primaria y células RPMI8226 se resumen también en las figuras 4 y 6 y las Tablas 4 y 6.

## 5 Ejemplo 5 - Generación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3

### Ejemplo 5.1. Generación de anticuerpos anti-CD3

10 Las siguientes secuencias de proteínas de las regiones VH y VL se utilizaron para generar anticuerpos de CD3 reactivos de forma de entrecruzamiento humanos y de mono cynomolgus.

#### CH2527\_VH (SEQ ID NO:21):

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYA  
DSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTLTVSS

#### CH2527\_VL (SEQ ID NO:22)

20 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARF  
SGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

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

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

### Ejemplo 5.2. Generación de formato 1 + 1 biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 (es decir, anticuerpo biespecífico (Fab) x (Fab) de un brazo monovalente para ROR1 y monovalente para CD3)

35 A) Un anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 de acuerdo con la invención tendría la ventaja de una vida media de eliminación de aproximadamente 1 a 12 días que permite una administración al menos una o dos veces por semana.

40 Células T anti-ROR1/anti-CD3 biespecíficas del formato 1 + 1 de un brazo (es decir, anticuerpo biespecífico (Fab) x (Fab) monovalente para ROR1 y monovalente para CD3) se producen con los anticuerpos anti-ROR1 generados a partir del Ejemplo 1 .cDNA que codifican los Fab completos (dominios VH y CH1 de cadena pesada más dominios VL y CL de cadena ligera) de los correspondientes anticuerpos IgG1 anti-ROR1, como se describe en el Ejemplo 1, así como los cDNA anti-CD3 VH y VL descritos en el Ejemplo 5.1, se utilizan como materiales de partida. Para cada anticuerpo biespecífico, están implicadas cuatro cadenas de proteínas que comprenden las cadenas pesada y ligera del correspondiente anticuerpo anti-ROR1 y las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente.

45 b) Para la generación de vectores de anticuerpos biespecíficos ROR1xCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos en dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y ROR1. Los restos de unión al antígeno son fragmentos Fab compuestos por una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales comprende una región variable y una constante. Al menos uno de los fragmentos Fab es un fragmento "Crossfab", en el que se intercambian los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab. El intercambio de dominios constantes de cadena pesada y ligera dentro del fragmento Fab asegura que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tengan arreglos de dominios idénticos y, en consecuencia, no intercambien cadenas ligeras. El diseño de la molécula biespecífica puede ser monovalente para ambos determinantes antigénicos (1 + 1) o monovalente para CD3 y bivalente para ROR1, donde un fragmento Fab se fusiona al extremo N-terminal del CrossFab interno (2 + 1). En la Figura 1 se proporciona una representación esquemática de las construcciones. Las secuencias de las construcciones se muestran en las SEQ ID NO 2 a 36. Las moléculas se producen mediante cotransfección de células HEK293 EBNA basadas en polímero que crecen en suspensión con la expresión de mamífero. Para la preparación de construcciones de CrossFab-IgG 1 + 1, las células se transfectan con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1: 1: 1: 1 ("vector Fc (botón)": "cadena ligera de vector": "cadena ligera de vector CrossFab" : "vector de cadena pesada-CrossFab").

### Ejemplo 5.3. Generación de formato 2 + 1 biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 (es decir, anticuerpo bivalente (Fab)<sub>2</sub> x (Fab) bivalente para ROR1 y monovalente para CD3)

65 A) Un anticuerpo biespecífico de células T anti-ROR1/anti-CD3 con un formato 2 + 1, es decir, un anticuerpo biespecífico (Fab)<sub>2</sub> x (Fab) que es bivalente para ROR1 y monovalente para CD3 tendría ventajas sobre la potencia

y la previsibilidad por su eficacia y seguridad porque se uniría preferentemente al tumor diana ROR1 y evitaría el hundimiento del anticuerpo CD3, lo que aumentaría la probabilidad de exposición al fármaco centrada en el tumor.

Células T anti-ROR1/anti-CD3 biespecíficas del formato 2 + 1 (es decir, bivalentes (Fab)<sub>2</sub> x (Fab) anticuerpos bivalentes para ROR1 y monovalentes para CD3 se producen con los anticuerpos anti-ROR1 generados en el Ejemplo 1. Los ADNc que codifican los Fab completos (dominios VH y CH1 de cadena pesada más dominios VL y CL de cadena ligera) de los correspondientes anticuerpos IgG1 anti-ROR1, como se describe en el Ejemplo 1, así como los cDNA anti-CD3 VH y VL descritos en el Ejemplo 5.1, son para cada anticuerpo biespecífico, están implicadas cuatro cadenas de proteínas que comprenden las cadenas pesada y ligera del correspondiente anticuerpo anti-ROR1 y las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente.

b) Para la generación de los vectores de anticuerpos biespecíficos ROR1xCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos en dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y ROR1. Los restos de unión al antígeno son fragmentos Fab compuestos por una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales comprende una región variable y una constante. Al menos uno de los fragmentos Fab es un fragmento "CrossFab", en el que se intercambian los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab. El intercambio de dominios constantes de cadena pesada y ligera dentro del fragmento Fab asegura que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tengan arreglos de dominios idénticos y, en consecuencia, no intercambien cadenas ligeras. El diseño de la molécula biespecífica puede ser monovalente para ambos determinantes antigénicos (1 + 1) o monovalente para CD3 y bivalente para ROR1, donde un fragmento Fab se fusiona al extremo N-terminal del CrossFab interno (2 + 1). En la Figura 1 se da una representación esquemática de las construcciones; Las secuencias de las construcciones se muestran en las SEQ ID NO 1 a 62. Las moléculas se producen mediante la cotransfección de células HEK293 EBNA basadas en polímero que crecen en suspensión con la expresión de mamífero. Para la preparación de construcciones 2 + 1 CrossFab-IgG, las células se transfectan con los vectores de expresión correspondientes en una proporción de 1: 2: 1: 1 ("vector Fc (botón)": "cadena ligera de vector": "cadena ligera de vector CrossFab": "vector de cadena pesada-CrossFab").

#### **Ejemplo 5.4. Producción y purificación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 con o sin variantes de carga**

Para la producción de los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos biespecíficos se expresan por transitoria a base de polímero co-transfección de los respectivos vectores de expresión de mamífero en células HEK293-EBNA, que se cultivan en suspensión. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se siembran a 1,5 millones de células viables/ml en medio Ex-Cell, suplementado con 6 mM de L-glutamina. Por cada ml de volumen de producción final se centrifugan 2,0 millones de células viables (5 minutos a 210 xg). Se aspira el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 µl de medio CD CHO. El ADN de cada ml de volumen de producción final se prepara mezclando 1 µg de ADN (Relación cadena pesada: cadena pesada modificada: cadena ligera: cadena ligera modificada = 1: 1: 2: 1) en 100 µL de medio CD CHO. Después de la adición de 0,27 µl de solución de polímero (1 mg/ml), la mezcla se agita con vórtex durante 15 segundos y se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de 10 minutos, las células resuspendidas y la mezcla de ADN/polímero se juntan y luego se transfieren a un recipiente apropiado que se coloca en un dispositivo de agitación (37 ° C, 5% CO<sub>2</sub>). Después de un tiempo de incubación de 3 horas, se añaden 800 µl de medio Ex-Cell, suplementado con L-glutamina 6 mM, ácido valproico 1,25 mM y Pepsoy al 12,5% (50 g/L) por cada ml de volumen de producción final. Después de 24 horas, se agregan 70 µL de solución de alimentación por cada ml de volumen de producción final. Después de 7 días o cuando la viabilidad celular es igual o inferior al 70%, las células se separan del sobrenadante mediante centrifugación y filtración estéril. Los anticuerpos se purifican mediante un paso de afinidad y uno o dos pasos de pulido, siendo cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Cuando es necesario, se utiliza un paso de pulido adicional.

Para la etapa de afinidad, el sobrenadante se cargó en una columna de proteína A (Protein A HiTrap FF, 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 6 CV 20 mM de fosfato de sodio, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Después de una etapa de lavado con el mismo tampón, el anticuerpo se eluye de la columna por etapa de elución con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. Las fracciones con el anticuerpo deseado se neutralizan inmediatamente con fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0 (1:10), se combinan y se concentran por centrifugación. El concentrado se esteriliza por filtración y se procesa adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la etapa de cromatografía de intercambio catiónico la proteína concentrada se diluye 1:10 con el tampón de elución utilizado para la etapa de afinidad y se cargó en un columa de intercambio catiónico (Poros 50 HS Applied Biosystems). Después de dos pasos de lavado con el tampón de equilibrio y un tampón de lavado resp. Fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, pH 5,0 y fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM pH 5,0, la proteína se eluye con un gradiente usando fosfato de sodio 20 mM, Citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 8,5. Las fracciones que contienen el anticuerpo deseado se reúnen, se concentran por centrifugación, se esterilizan por filtración y se procesan en una etapa de exclusión por tamaño.

Para la etapa de exclusión de tamaño de la proteína concentrada se inyecta en una HiLoad Superdex columna XK16/60 200 (GE Healthcare), e histidina 20 mM, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6,0 con o sin Tween 20 como

tampón de formulación. Las fracciones que contienen los monómeros se reúnen, se concentran por centrifugación y se filtran de forma estéril en un vial estéril.

5 La determinación de la concentración de anticuerpo se realiza midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando el valor teórico de la absorbancia de una solución al 0,1% del anticuerpo. Este valor se basa en la secuencia de aminoácidos y se calcula mediante el software GPMW (datos de Lighthouse).

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

15 Para comprobar el peso molecular de las preparaciones de proteína final y confirman la preparación homogénea de las moléculas se utiliza solución de proteína final, espectrometría de masas-cromatografía líquida (LC-MS). Primero se realiza una etapa de desglucosilación. Para eliminar la heterogeneidad introducida por los carbohidratos, las construcciones se tratan con PNGaseF (ProZyme). Por tanto, el pH de la solución de proteína se ajusta a pH 7,0 añadiendo 2 µl de Tris 2 M a 20 µg de proteína con una concentración de 0,5 mg/ml. Se añaden 0,8 µg de PNGaseF y se incuban durante 12 ha 37°C. Luego se realiza la detección en línea LC-MS. El procedimiento LC-MS se realiza en un Agilent HPLC 1200 acoplado a un espectrómetro de masas TOF 6441 (Agilent). La separación cromatográfica se realiza en una columna Macherey Nagel Polysterene; RP1000-8 (tamaño de partícula de 8 µm, 4,6 x 250 mm; n° de catálogo 719510). El eluyente A es acetonitrilo al 5% y ácido fórmico al 0,05% (v/v) en agua, el eluyente B era acetonitrilo al 95%, agua al 5% y ácido fórmico al 0,05%. El caudal fue de 1 ml/min, la separación se realizó a 40 ° C y 6 µg (15 µl) de una muestra de proteína obtenida con un tratamiento como se describió anteriormente (tabla 8).

25 Tabla 8

Tiempo (min)	% B
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

35 Durante los primeros 4 minutos, el eluido se dirige al residuo para proteger el espectrómetro de masas de la contaminación por sal. La fuente de ESI estaba funcionando con un flujo de gas de secado de 12 l/min, una temperatura de 350 °C y una presión del nebulizador de 60 psi. Los espectros de MS se adquieren usando un voltaje de fragmentador de 380 V y un rango de masas de 700 a 3200 m/z en modo de iones positivos. Los datos de MS son adquiridos por el software del instrumento de 4 a 17 minutos.

40 Una serie de producción de cabeza a cabeza para comparar el perfil de producción/purificación de anticuerpos ROR1xCD3-TCB sin variante carga vs. ROR1xCD3-TCBcv (con variantes de carga) se lleva a cabo a continuación, para evaluar adicionalmente las ventajas de las modificaciones de carga de CL-CH1 aplicadas a los anticuerpos biespecíficos de células T.

45 La Tabla 8-1 muestra el perfil de producción/purificación favorable de tres moléculas de ROR1xCD3-TCB con variantes de carga siguiendo procedimientos de purificación estándar no optimizados que incluyen cromatografía de afinidad de proteína A (PA) y purificación cromatográfica de exclusión por tamaño (SEC).

50 **Tabla 8-1:** Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 con variantes de carga siguiendo procedimientos de purificación estándar no optimizados

	Título (mg/l)	Contenido de monómero (%)	Pureza (%)
Mab2 ROR1-TCBv	40,71	100	98,66
Mab3 ROR1-TCBv	104,12	100	93,78
Mab4 ROR1-TCBv	25,36	99,03	97,69

55 La Figura 3-1 representa los gráficoSEC-SDS (no reducidos) de las preparaciones proteicas finales después de diferentes procedimientos de purificación para otra molécula de TCB sin o con variantes de carga, a saber, anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. Las etapas de purificación por cromatografía de afinidad de proteína A (PA) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) aplicadas al anticuerpo 83A10-TCB dieron como resultado una pureza de <30% y 82,8% de contenido de monómero (A). Cuando se aplicaron etapas de purificación adicionales, incluida la cromatografía de intercambio catiónico (cIEX) y una etapa cromatográficas de exclusión por tamaño final

(re-SEC) a las preparaciones de proteínas finales en (A), la pureza se incrementó al 93,4% pero el contenido de monómero permaneció igual y el rendimiento se redujo significativamente a 0,42 mg/L. Sin embargo, cuando se aplicaron modificaciones de carga específicas al anti-BCMA Fab CL-CH183A10, a saber, el anticuerpo 83A10-TCBcv, ya se pudo observar un perfil de producción/purificación superior de la molécula TCB, como lo demuestra una pureza del 95,3%, un contenido de monómero del 100% y rendimiento de hasta 3,3 mg/L, incluso cuando se aplicaron las etapas de purificación PA + cIEX + SEC (C) en comparación con (B) con un perfil de producción/purificación que muestra un rendimiento 7,9 veces menor y un 17,2% menor contenido de monómero a pesar de incluir una etapa de purificación adicional de re-SEC.

Una serie de producción de cabeza a cabeza para comparar el perfil de producción/purificación de 83A10-TCB vs. anticuerpos 83A10-TCBcv a continuación fue realizado para evaluar aún más las ventajas de las modificaciones de carga CL-CH1 aplican a los anticuerpos. Las moléculas 83A10-TCB y 83A10-TCBcv son ambas de formato molecular como se describe en la Figura 2a de PCT/EP2015/067841. Como se muestra en la Figura 3-2, las propiedades de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se midieron una al lado de la otra y se compararon después de cada paso de purificación 1) Solo cromatografía de afinidad PA (A, B), 2) Cromatografía de afinidad PA y luego SEC (C, D) y 3) cromatografía de afinidad PA, luego SEC, luego cIEX y re-SEC (E, F). En la Figura 3-2 se muestran los gráficos SEC-SDS (no reducidos) de las soluciones proteicas finales después de los procedimientos respectivos de purificación para los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. Como se muestra en las Figuras 3-2A y 3-2B, ya se observaron mejoras con la aplicación de las variantes de carga al anticuerpo TCB después de la purificación por cromatografía de afinidad PA solamente. En este estudio de cabeza a cabeza, la etapa de purificación por cromatografía de afinidad PA aplicada al anticuerpo 83A10-TCB dio como resultado una pureza del 61,3%, un rendimiento de 26,2 mg/L y el 63,7% de contenido de monómero (3-2A). En comparación, cuando el anticuerpo 83A10-TCBcv se purificó mediante cromatografía de afinidad PA, todas las propiedades mejoraron con una mejor pureza del 81,0%, un mejor rendimiento de 51,5 mg/L y un 68,2% de contenido de monómero (3-2B). Cuando se aplicó un paso adicional de purificación de SEC a las preparaciones de proteínas finales como se ve en las Figuras 3-2A y 3-2B, 83A10-TCB ganó una pureza del 69,5%, un rendimiento de 14,1 mg/L y 74,7% de contenido de monómero (3-2C) en comparación con 83A10-TCBcv con una pureza y un contenido de monómeros mejorados de hasta 91,0% y 83,9% respectivamente, y un rendimiento de 10,3 mg/L

(3-2D). Aunque el rendimiento fue ligeramente menor (es decir, 27% menos) para 83A10-TCBcv que para 83A10-TCB en este experimento en particular, el porcentaje de molécula correcta fue mucho mejor para 83A10-TCBcv que para 83A10-TCB, respectivamente 90% vs. 40-60%, medido por LC-MS. En la tercera comparación directa, las preparaciones de proteínas finales 83A10-TCB y 83A10-TCBcv de las Figuras 3-2C y 3-2D se combinaron con aproximadamente 1 L (equivolumen) de las respectivas preparaciones de proteínas finales de otro lote de purificación (misma producción) después de la etapa de purificación por cromatografía de afinidad PA únicamente. A continuación, las preparaciones de proteínas combinadas se purificaron adicionalmente mediante los procedimientos de purificación cIEX y SEC. Como se muestra en las Figuras 3-2E y 3-2F, se observó consistentemente una mejora del perfil de producción/purificación del anticuerpo TCB con las variantes de carga en comparación con el anticuerpo TCB sin variante de carga. Después de que se utilizaron varios pasos de procedimientos de purificación (es decir, PA +/- SEC + cIEX + SEC) para purificar el anticuerpo 83A10-TCB, solo se alcanzó el 43,1% de pureza y se pudo alcanzar el 98,3% de contenido de monómero, pero en detrimento del rendimiento que se redujo a 0,43 mg/L. El porcentaje de molécula correcta según lo medido por LC-MS fue todavía pobre con 60-70%. Al final, la calidad de la preparación de proteína final no fue aceptable para uso in vitro. En marcado contraste, cuando se aplicaron los mismos pasos de purificación múltiple con la misma cronología al anticuerpo 83A10-TCBcv, se alcanzó una pureza del 96,2% y un contenido de monómero del 98,9%, así como el 95% de la molécula correcta medida por LC-MS. Sin embargo, el rendimiento también se redujo en gran medida a 0,64 mg/L después de la etapa de purificación de cIEX. Los resultados muestran que se puede lograr una mejor pureza, un mayor contenido de monómero, un mayor porcentaje de molécula correcta y un mejor rendimiento con el anticuerpo 83A10-TCBcv solo después de dos pasos de purificación estándar, es decir, cromatografía de afinidad PA y SEC (Figura 3-2D), mientras que tales propiedades no pudieron lograrse con 83A10-TCB incluso cuando se aplicaron pasos de purificación adicionales (Figura 3-2E).

La Tabla 8-2 resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCBcv después de la etapa de purificación de PA. La Tabla 8-3 resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCBcv después de las etapas de purificación de PA y SEC. La Tabla 8-4 resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCBcv después de PA y SEC más PA solo, luego etapas de purificación de cIEX y re-SEC. Para las Tablas 8-2 a 8-4, los valores en negrita resaltan la propiedad superior en comparación entre 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. Con una excepción (es decir, rendimiento respectivamente a cantidad, ver Tabla 8-3) que puede no ser representativa, todos los parámetros y valores de producción/purificación resultantes de los 3 experimentos de comparación directa fueron superiores para 83A10-TCBcv en comparación con 83A10-TCB. Los resultados generales demuestran claramente que se podrían lograr ventajas en las características de producción/purificación aplicando modificaciones de carga de CL-CH1 a los anticuerpos TCB y que solo se requerían dos etapas de purificación (es decir, cromatografía de afinidad PA y SEC) para lograr preparaciones de proteínas de alta calidad con muy buenas propiedades de desarrollo.

**Tabla 8-2:** Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 después de la etapa de purificación por cromatografía de afinidad de proteína A

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	61,3	<b>81,0</b>
Rendimiento (mg/l)	26,2	<b>51,5</b>
Cantidad (mg)	24,3	<b>50,2</b>
Monómero (%)	63,7	<b>68,2</b>
Molécula correcta mediante LC-MS (%)	n.d.	n.d.

5

**Tabla 8-3:** Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 después de las etapas de purificación por cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	69,5	<b>91,0</b>
Rendimiento (mg/l)	<b>14,1</b>	10,3
Cantidad (mg)	<b>13,1</b>	10,0
Monómero (%)	74,7	<b>83,9</b>
Molécula correcta mediante LC-MS (%)	40-60	<b>90</b>

**Tabla 8-4:** Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 después de 1.a) Cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión de tamaño y 1.b) Cromatografía de afinidad de proteína A solo agrupada y entonces etapas de purificación por 2) cromatografía de intercambio catiónico y 3) cromatografía de exclusión por tamaño final

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	43,1	<b>96,2</b>
Rendimiento (mg/l)	0,43	<b>0,64</b>
Cantidad (mg)	0,73	<b>1,27</b>
Monómero (%)	98,3	<b>98,9</b>
Molécula correcta mediante LC-MS (%)	60-70%	<b>&gt; 95%</b>

15

**Ejemplo 6 - Unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a células B-CLL positivas a ROR1 o células de mieloma o CD3 en células T (citometría de flujo)**

a) Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 5 también se analizaron mediante citometría de flujo para determinar sus propiedades de unión a ROR1 humano expresado en células B-CLL primarias o CD3 humano expresado en células T leucémicas humanas Jurkat (ATCC TIB-152). Se cultivaron células T Jurkat en RPMI suplementado con suero de ternero fetal al 10%. Brevemente, se recolectaron las células cultivadas, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. A continuación, las células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en tampón de tinción FACS (BD Biosciences) que contenía BSA al 0,1%. Se tomaron alícuotas adicionales de 100  $\mu$ l de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron 30  $\mu$ l de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 marcados con Alexa488 o el correspondiente control de IgG a los pocillos que contenían células para obtener concentraciones finales de 3 nM a 500 nM o de 0,1 pM a 200 nM. Se utilizaron anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 e IgG de control con la misma molaridad. Después de la incubación durante 30 min a 4 °C, las células se centrifugaron (5 min, 350 xg), se lavaron dos veces con 150  $\mu$ l/pocillo de tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences), a continuación las células se fijaron usando 100  $\mu$ l de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 120  $\mu$ l de tampón FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. Se evaluó la unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a células B-CLL y células T y se determinó la intensidad de fluorescencia media en células B-CLL que expresan ROR1 o células T Jurkat que expresan CD3 y se trazó en histogramas o gráficos de puntos. La Figura 7 muestra la intensidad de fluorescencia media para anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 que se unen a células T Jurkat y se representa en función de la concentración de anticuerpos. No se alcanzaron los valores de CE50 y la unión máxima de anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1 y anti-ROR1/anti-CD3 TCB2 + 1 a las células Jurkat. Curiosamente, el anticuerpo ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1 se une de forma más eficaz a las células T Jurkat que el anticuerpo ROR1/anti-CD3 TCB2 + 1. El anticuerpo de control de isotipo DP47 o el anticuerpo IgG anti-ROR1 no se unieron a las células T Jurkat.

b) Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 se analizaron mediante citometría de flujo para la unión a ROR1 humano en células RPMI8226 de mieloma que expresan ROR1. Brevemente, se recolectaron las células cultivadas, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. A continuación, las células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en tampón de tinción FACS que contenía BSA (BD Biosciences). Se tomaron alícuotas adicionales de 100  $\mu$ l de esta suspensión de células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 30  $\mu$ l de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 marcados con



Alexa488 o el control de IgG correspondiente durante 30 min a 4°C. ° C. Todos los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 (y el control de isotipo) se valoraron y analizaron en un intervalo de concentración final entre 0,136 y 13,6 nM. Para las muestras que usan anticuerpos no marcados, las células se centrifugaron (5 min, 350 xg), se lavaron con 120µl/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences), se resuspendieron e incubaron durante 30 min más a 4 ° C con AlexaFluor 647 conjugado con fluorocromo Fragmento AffiniPure F (ab ') 2 conjugado de cabra anti-IgG humana Fc específico (Jackson Immuno Research Lab; 109-606-008). Después, las células se lavaron dos veces con tampón de tinción (BD Biosciences), se fijaron usando 100 ul de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 ° C durante 20 min, se resuspendieron en 120 µl de tampón FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. La Figura 8 muestra la intensidad de fluorescencia media para los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 representados en función de la concentración de anticuerpos: anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1 y anti-ROR1/anti-CD3 TCB2 + 1 en RPMI8226. Los valores de CE50 de las células (que indican la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar el 50% de la unión máxima) para la unión de anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1 y anti-ROR1/anti-CD3 TCB2 + 1 a células RPMI8226 se resumen en Tabla 3. El anticuerpo anti-ROR1/anti-CD3 TCB2 + 1 bivalente para ROR1 parece unirse a las células de mieloma RPMI8226 positivas para ROR1 ligeramente mejor que el anticuerpo anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1 que es monovalente a ROR1, según lo detectado por FACS (Figura 8). También se demostró que los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 TCB se unían a las células B-CLL primarias detectadas por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-Fc humano secundario conjugado con fluorocromo (Figura 2A).

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

	Anticuerpo anti-ROR1/anti-CD3 TCB1+1	Anticuerpo anti-ROR1/anti-CD3 TCB2+1
CE <sub>50</sub> (nM)	1,1	0,56
CE50 (µg/ml)	0,16	0,11

**Ejemplo 6.1 - Unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a células de cáncer de ovario y células T (medido por citometría de flujo)**

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 5 se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su unión a las líneas celulares de cáncer de ovario humano PA-1 y SK-OV-3 y CD3 humana expresada en células T leucémicas humanas Jurkat (ATCC TIB-152). Se cultivaron células T Jurkat en medio RPMI1640 suplementado con suero de ternero fetal al 10%. Brevemente, las células cultivadas se recolectaron, contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. A continuación, las células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en tampón de tinción FACS (BD Biosciences) que contenía BSA al 0,1%. Se tomaron alícuotas adicionales de 100 µl de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron 30 µl de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 marcados con Alexa488 o el control de IgG correspondiente a los pocillos que contienen células para obtener concentraciones finales de 1 nM a 500 nM (células T Jurkat) o 0,1 nM a 100 nM (células de cáncer de ovario humano). Se utilizaron anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 e IgG de control con la misma molaridad. Después de la incubación durante 30 min a 4 ° C, las células se centrifugan (5 min, 350 xg), se lavan dos veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences), luego las células se fijan usando 100 ul de tampón de fijación BD por pocillo (# BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendió en 120 µl de tampón FACS y se analizó usando BD FACS Cantoll. Se evaluó la unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 a células de cáncer de ovario humano y células T y se determinó la intensidad de fluorescencia media en células de cáncer de ovario humano o células T Jurkat que expresan CD3 y se representó en histogramas y diagramas de puntos. Para las muestras que usan anticuerpos no marcados, las células se centrifugaron (5 min, 350 xg), se lavaron con 120µl/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences), se resuspendieron e incubaron durante 30 min más a 4 ° C con AlexaFluor 647 conjugado con fluorocromo Fragmento AffiniPure F (ab ') 2 conjugado de cabra anti-IgG humana Fc específico (Jackson Immuno Research Lab; 109-606-008). Después, las células se lavaron dos veces con tampón de tinción (BD Biosciences), se fijaron usando 100 ul de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 ° C durante 20 min, se resuspendieron en 120 µl de tampón FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. Se trazó la intensidad de fluorescencia media para anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en función de las concentraciones de anticuerpos. Los valores de CE50 (que indican la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar el 50% de la unión máxima) para la unión de anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 a células de cáncer de ovario humano se midieron usando Prism (GraphPad). Como se muestra en la Figura 3-3, hubo una unión dependiente de la concentración de ROR1 Mab2 IgG y ROR1 Mab2-TCBcv en SK-OV-3 (A) y en líneas celulares de cáncer de ovario humano PA-1 (B) según lo medido por un aumento de la señal de intensidad de fluorescencia mediana en función de las concentraciones de anticuerpos. Tales señales positivas no se observaron cuando se probó la unión de TCB de control a CD3 solamente y no a ROR1 en líneas celulares de cáncer de ovario SK-OV-3 y PA-1 (A y B; círculoSECrrados). Como se muestra en la Figura 3-4, hubo una unión dependiente de la concentración de ROR1 Mab2-TCBcv y control-TCB en células T Jurkat, lo que confirma que ambos anticuerpos TCB se unen a CD3 en células T.

**Ejemplo 7 - La internalización de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en línea de**

**células B-CLL EHEB o PBMC primarias de pacientes con CLL o células de MM RPMI8226 (citometría de flujo).**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 **Ejemplo 8 - Activación de las células T tras el acoplamiento de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 (citometría de flujo)**

20 a) Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 T generados en el Ejemplo 3 fueron también analizados mediante citometría de flujo por su potencial para inducir la activación de células T mediante la evaluación de la expresión en la superficie del marcador de activación temprana CD69, o el marcador de activación tardía CD25 en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en presencia o ausencia de células positivas de ROR1  
 25 humanas. Brevemente, se recogieron las células positivas de ROR1 con tampón de disociación celular, se contaron y la viabilidad celular se verificó usando ViCell. Las células viables de B-CLL se ajustaron a 0,2 x 10<sup>6</sup> células/ml en RPMI suplementado con FCS al 10%, se pipetearon 100 µl de esta suspensión de células por pocillo en una placa de base redonda de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de las construcciones biespecíficas de células T a los pocillos que contienen células positivas de ROR1 para obtener una concentración final de 0,01 fM a 100 pM o de 0,01 pM a  
 30 100 nM. La placa de 96 pocillos se dejó de lado y se mantuvo a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> hasta manipulaciones posteriores.

Se aislaron PBMC a partir de sangre fresca utilizando centrifugación en gradiente de densidad utilizando tubos de preparación celular con citrato de sodio (tubos Vacutainer CPT, BD Biosciences). Las células T humanas totales se aislaron a continuación utilizando el kit de aislamiento de células T Pan II (Miltenyi Biotec), según las instrucciones  
 35 del fabricante. En algunos estudios, los clones de células T CD8 se usaron como efectores. Se purificaron células T CD8 específicas para NLV (un péptido específico de CMV reconocido por HLA-A2) a partir de PBMCs de donantes sanos HLA-A2<sup>+</sup> utilizando anticuerpos aCD8 y tetrámeros específicos para HLA-A2 en complejo con péptido NLV y clasificado con un clasificador de células. Las células purificadas se expandieron en preparaciones alimentadoras irradiadas obtenidas a partir de PBMC de donantes sanos y LCL (células linfoblastoides) HLA-A2<sup>+</sup> pulsadas con péptido NLV en medios (RPMI1640 + FBS al 10% + L-glutamina al 1%) con 400 UI de IL-2. Los clones de células T  
 40 CD8 específicas de NLV se mantuvieron en el mismo medio con 400 UI de IL-2 y se reactivaron periódicamente sobre preparaciones alimentadoras. Las células T humanas totales o clones de células T CD8 (efectoras) se ajustaron a continuación a 2 x 10<sup>6</sup> células por ml en RPMI suplementado con FCS al 10%. Se añadieron 50 µl de esta suspensión de células por pocillo en la placa de ensayo que contenía ya las células diana positivas de ROR1  
 45 para obtener una relación final E:T de 3:1 (células T CD8 como efectores) o 10:1 (PBMC como efectores). Para probar si las construcciones biespecíficas de células T eran capaces de activar células T en presencia de solo células diana tumorales positivas de ROR1, también se incluyeron pocillos que contenían una concentración o concentraciones finales en el intervalo de 0,01 fM a 100 pM o de 0,01 pM a 100 nM de las respectivas moléculas

biespecíficas con células efectoras pero sin células diana tumorales positivas de ROR1. Después de incubación durante 6 a 24 horas (clones de células T CD8 como efectoras) o de 24 a 48 horas (PBMC como efectoras) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, las células se sedimentaron por centrifugación (5 min, 350 xg) y se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences). La tinción de la superficie de las células efectoras con anticuerpos conjugados con fluorocromo seleccionados contra CD4, CD8, CD69 o CD25 humanos (BD Biosciences) se realizó a 4 °C durante 30 min, protegidos de la luz, en tampón de tinción FACS (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS, se fijaron entonces usando 100 µl de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 120 µl de tampón FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. La expresión de los marcadores de activación CD69 o CD25 se determinó mediante la medición de la intensidad de fluorescencia media limitada a poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> como se representa en histogramas o gráficos de puntos.

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

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

**Ejemplo 8.1 - Activación de células T tras el acoplamiento de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en presencia de células de cáncer de ovario (citometría de flujo)**

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 5 también se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su potencial para inducir la activación de las células T mediante la evaluación de la expresión superficial del marcador de activación temprana CD69 y/o la activación tardía. marcador CD25 en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en presencia de líneas celulares de cáncer de ovario humano positivas para ROR1 PA-1 y/o SK-OV-3. En resumen, las células diana de cáncer de ovario humano se recolectaron con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron en placas a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad histopaca de preparaciones de linfocitos enriquecidos (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos. La sangre fresca se diluyó con PBS estéril y se colocó en capas sobre gradiente Histopaque (Sigma, # H8889). Después de la centrifugación (450 xg, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contiene PBMC se descartó y las PBMC se transfirieron a un nuevo tubo Falcon que posteriormente se llenó con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 xg, 10 minutos, temperatura ambiente), el sobrenadante se descartó y el sedimento de PBMC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 xg, 10 minutos). La población PBMC resultante se cuenta automáticamente (ViCell) y se almacena en un medio respectivo cultivo de acuerdo con el proveedor línea celular (véase el Ejemplo 2.1) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para examinar la activación de células T inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3, se expusieron células de cáncer de ovario humano al anticuerpo biespecífico a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,1 pM a 200 nM por triplicado). A continuación, se añadieron PBMC a las células diana de cáncer de ovario humano en una relación de efectora final a diana (E: T) de 10: 1. La activación de células T se evaluó después de 24 a 48 h de incubación a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Después del período de incubación, se recogieron las células de los pocillos, se sedimentaron mediante centrifugación (5 min, 350 xg) y se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences). Tinción de la superficie de las células efectoras con anticuerpos conjugados con fluorocromo seleccionados contra CD4 humano (IgG1 de ratón, K; clon RPA-T4), CD8 (IgG1 de ratón, K; clon HIT8a; BD # 555635), CD69 (IgG1 de ratón; clon L78; BD # 340560) y CD25 (IgG1 de ratón, K; clon M-A251; BD # 555434) se realizó a 4 °C durante 30 min, protegido de la luz, en FACS Stain Buffer (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS y luego se fijaron usando 100 µl de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 120 µl de tampón FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. La expresión de los marcadores de activación CD69 o CD25 se determinó midiendo la intensidad de fluorescencia media activada en las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> como se representa en histogramas o gráficos de puntos. Como se muestra en la Figura 9.1, ROR1 Mab2-TCBcv (cuadrados) indujo un aumento dependiente de la concentración del marcador de activación temprana CD69 que se observó en las células T CD4<sup>+</sup> (A) y las células T CD8<sup>+</sup> (B) en presencia de SK- de baja expresión de ROR1 Las células diana OV-3 mientras que el control-TCB (triángulos) no indujeron ninguna activación de las células T. A una concentración clínicamente relevante de 1 nM de ROR1 Mab2-TCBcv, ya

había hasta un 40% de células T CD4 activadas y un 25% de células T CD8 activadas después de 48 h de incubación.

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

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 se analizaron también por su potencial para inducir apoptosis mediada por células T en células de mieloma múltiple que expresan ROR1 tras la reticulación de la construcción a través de la unión de los restos de unión a antígeno a ROR1 en las células. Brevemente, se recogieron células diana de mieloma múltiple RPMI-8226 que expresaban ROR1 humano (disponibles de la American Type Culture Collection; ATCC CCL-155) con tampón de disociación celular, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con FCS al 10%. Aproximadamente 30.000 células por pocillo se sembraron en una placa de base redonda de 96 pocillos y se añadió la dilución respectiva de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); variando las concentraciones finales de 0,01 fM a 100 pM o de 0,2 nM a 30 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones biespecíficas de células T y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células T totales humanas o clones de células T CD8 (efectores) en los pocillos para obtener una relación final E:T de 3: 1. Cuando se usaron PBMC humanas como células efectoras, se usó una relación final E:T de 10:1. PHA-L (Sigma) se utilizó como control positivo para la activación de las células T humanas a una concentración de 1 µg/ml. Los grupos de control negativos estuvieron representados por células efectoras o diana solas. Para la normalización, la lisis máxima de las células diana de mieloma múltiple RPMI-8226 (= 100%) se determinó mediante incubación de las células diana con una concentración final de 1% de Triton X-100, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células diana coincubadas con células efectoras solas, es decir sin ningún anticuerpo biespecífico de células T. Después de 6 a 24 horas de incubación (clones de células T CD8 como efectores) o de 24 a 48 horas de incubación (PBMC como efectores) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, se midió entonces la liberación de LDH de las células diana apoptóticas/necróticas positivas de ROR1 en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se representó frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en las curvas de concentración-respuesta. Los valores IC<sub>50</sub> se midieron usando software Prism (GraphPad) y se determinó como la concentración de anticuerpo biespecífico de células T que da lugar al 50% de la liberación de LDH.

La Figura 10 muestra la destrucción de células T redirigida de células diana de MM RPMI8226 positivas de ROR1 por células T CD8 activadas por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3. La citotoxicidad específica de las células diana (lisis tumoral) inducida por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 se midió mediante la liberación de LDH. (A) Experimento 1 (punto de tiempo 14 h): Se observó un aumento muy ligero dependiente de la concentración de la respuesta de lisis tumoral con anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3. Un 30% de lisis tumoral ya se observó con la concentración más baja ensayada de anticuerpo TCB1+1 anti-ROR1/anti-CD3 0,01 pM y se alcanzó una lisis tumoral de hasta el 37,5% con 30 nM de anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en condiciones experimentales que reflejan relación E:T clínicamente relevante de 3:1 es decir, 3 células T CD8 para 1 célula diana RPMI 8226. EC<sub>50</sub> no se pudo calcular. La lisis tumoral del 37,5% observada a 30 nM, tal como se detecta mediante la liberación de LDH no podría haber atribuirse solamente a la destrucción no específica de células diana, ya que sólo había un 17% de lisis de células diana no específicas con 30 nM de TCB1 + 1 no enlazador (es decir, se une a células efectoras, pero no a células diana). Para anticuerpo TCB2 + 1 anti-ROR1/anti-CD3, una lisis máxima de células diana del 30% ya se observó en la concentración más baja ensayada de 0,2 fM y no hubo una respuesta dependiente de la concentración con concentraciones crecientes de hasta 10 nM. Sin embargo, la lisis celular con TCB 2 + 1 no enlazador en una concentración de 30 nM estaba ya cerca al 30%. (B) Experimento 2 (punto de tiempo de 20 h): El estudio se repitió en RPMI8226 positivas de ROR1 y la medición de la liberación de LDH se evaluó después de la incubación durante 20 h. Se observó un 30-40% de lisis de células diana con anticuerpos TCB1 + 1 y TCB2 + 1 anti-ROR1/anti-CD3 a una concentración de 100 pM, mientras que los controles de TCB no enlazadores a 100 pM no indujeron ninguna lisis tumoral. Los resultados concuerdan con un aumento en la activación de células T, medida por la regulación positiva del marcador CD25 en células T CD8 (Figura 9B).

La Figura 11 muestra la destrucción de células T redirigidas de células diana MM RPMI8226 positivas para ROR1 por células T de PBMC activadas por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 en diferentes proporciones de células efectoras a células tumorales (E:T). La citotoxicidad específica de las células diana (lisis tumoral) inducida por anticuerpos TCB anti-ROR1/anti-CD3 se midió mediante la liberación de LDH. (A) Relación E:T = 10 PBMC: 1 célula RPMI8226 MM (punto de tiempo de 24 h): hubo una respuesta dependiente de la concentración con concentraciones crecientes de hasta 100 nM. Se observó una media máxima del 25% de lisis tumoral con anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1 y anti-ROR1/anti-CD3 TCB2 + 1 de concentración 100 nM en condiciones experimentales con una relación E: T de 10: 1 es decir 10 PBMC para 1 célula diana RPMI8226. El 25% de lisis tumoral observado a 100 nM detectado por la liberación de LDH no podría atribuirse solo a la destrucción inespecífica de las células diana, ya que solo hubo un 9% de lisis inespecífica de células diana con 100 nM de TCB2 + 1 no enlazador (es decir, se une a células efectoras pero no a las células diana). (B) Relación E: T = 25 PBMC: 1 célula RPMI8226 MM (punto de tiempo de 24 h): hubo una lisis tumoral dependiente de la concentración con concentraciones crecientes de anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1 hasta 2 nM. Ya se observó una media máxima del 30% de lisis tumoral con una

concentración 2 nM de anti-ROR1/anti-CD3 TCB1 + 1, pero la lisis tumoral pareció alcanzar una estabilización ya que la concentración de 100 nM no se asoció con una respuesta más alta.

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

**Ejemplo 10: LisiSEClular de células de cáncer de ovario humano (ensayo de liberación de LDH)**

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 generados en el Ejemplo 5 fueron analizados para la inducción de T citotoxicidad mediada por células en células de cáncer de ovario humano. Líneas celulares de cáncer de ovario humano PA-1, COLO-704, SK-OV-3 y OVCAR-5. En resumen, las células diana de cáncer de ovario humano se recolectaron con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron en placas a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad histopaca de preparaciones de linfocitos enriquecidos (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos. La sangre fresca se diluyó con PBS estéril y se colocó en capas sobre gradiente Histopaque (Sigma, # H8889). Después de la centrifugación (450 xg, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contiene PBMC se descartó y las PBMC se transfirieron a un nuevo tubo Falcon que posteriormente se llenó con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 xg, 10 minutos, temperatura ambiente), el sobrenadante se descartó y el sedimento de PBMC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 xg, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en el medio de cultivo respectivo según lo sugerido por el proveedor de la línea celular (ver Ejemplo 2.1) a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de destrucción, se añadió el anticuerpo TCB a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,1 pM a 200 nM por triplicado). Se añadieron PBMC a las células diana de cáncer de ovario humano en una relación de efector final a diana (E: T) de 10: 1. La muerte de las células diana se evaluó después de 24 a 48 h de incubación a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> mediante la cuantificación de la LDH liberada en los sobrenadantes por las células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, # 11644793001) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lisis máxima de las células diana (= 100%) se logró mediante la incubación de las células diana con Triton X-100 al 1%. La lisis mínima (= 0%) se refiere a células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica. El porcentaje de liberación de LDH se representó frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3 en las curvas de concentración-respuesta. LaSEC<sub>50</sub> valores se midieron usando software Prism (GraphPad) y se determinó como la concentración de anticuerpo biespecífico de células T que da como resultado 50% de la liberación máxima de LDH. Como se muestra en la Figura 12, ROR1 Mab2-TCBcv (cuadrados) indujo un aumento dependiente de la concentración en la lisis de células tumorales de células de cáncer de ovario PA-1 de alta expresión de ROR1 (A), COLO-704 (B) de expresión media de ROR1 y OVCAR -5 (C) células de cáncer de ovario y células de cáncer de ovario SK-OV-3 de baja expresión de ROR1 (D). Por el contrario, el control-TCB (A, B, C; círculos) que solo se une a CD3 no indujo la lisis de células tumorales a concentraciones clínicamente relevantes (es decir, hasta 10 nM). Se muestran experimentos representativos.

**Tabla 9:** Valores de CE50 para la lisiSEClular de líneas celulares de cáncer de ovario por anticuerpos biespecíficos de células T anti-ROR1/anti-CD3

Líneas de células de cáncer de ovario	ROR1 Mab2-TCBcv	
	CE50 medio (pM)	CE <sub>50</sub> medio (ng/ml)
PA-1 (n = 2)	14,6 (4,7-24,5)	2,9 (0,9-4,9)
COLO-704 (n = 1)	73,3	14,3
OVCAR-5 (n = 1)	53,4	10,7
SKOV-3 (n = 5)	707 (456-1003)	141,4 (91,2-200,6)

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3 $\epsilon$  humano y al dominio extracelular de ROR1 humano, que comprende:
- 5 a) un primer Fab que se une específicamente al dominio extracelular de ROR1 humano, en el que el primer Fab comprende una primera cadena ligera y una primera cadena pesada, en el que la primera cadena ligera comprende un dominio variable VL y un dominio constante CL, y en el que la primera cadena pesada comprende un dominio variable VH y un dominio constante CH1; y
- 10 b) un segundo Fab que se une específicamente a CD3 $\epsilon$  humano, en el que el segundo Fab comprende una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada, en el que la segunda cadena ligera es una cadena ligera de entrecruzamiento que comprende un dominio variable VH y un dominio constante CL, y en el que la segunda cadena pesada es una cadena pesada de entrecruzamiento que comprende un dominio variable VL y un dominio constante CH1; y en el que
- 15 en el dominio constante CL de la primera cadena ligera, el aminoácido en la posición 123 y el aminoácido en la posición 124 están sustituidos independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada, el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice UE de Kabat).
- 20 2. Anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3 $\epsilon$  humano y al dominio extracelular de ROR1 humano, que comprende:
- a) un primer Fab que se une específicamente al dominio extracelular de ROR1 humano, en el que el primer Fab comprende una primera cadena ligera y una primera cadena pesada, en el que la primera cadena ligera comprende un dominio variable VL y un dominio constante CL, y en el que la primera cadena pesada comprende un dominio
- 25 variable VH y un dominio constante CH1; y
- b) un segundo Fab que se une específicamente a CD3 $\epsilon$  humano, en el que el segundo Fab comprende una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada, en el que la segunda cadena ligera es una cadena ligera de entrecruzamiento que comprende un dominio variable VH y un dominio constante CL, y en el que la segunda cadena pesada es una cadena pesada de entrecruzamiento que comprende un dominio variable VL y un dominio constante
- 30 CH1; y en el que
- en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera, el aminoácido en la posición 123 y el aminoácido en la posición 124 están sustituidos independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada, el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D)
- 35 (numeración según el índice EU de Kabat).
3. Anticuerpo biespecífico, según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo biespecífico comprende además un tercer Fab, en el que el tercer Fab es idéntico al primer Fab.
- 40 4. Anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:
- a) el dominio variable VH de la segunda cadena pesada comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 23, 24 y 25 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, respectivamente, y el dominio variable VL de la segunda cadena ligera comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 26, 27 y 28 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$ , opcionalmente en el que los dominios variables tienen las
- 45 secuencias expuestas en SEQ ID NO: 21 y 22; o
- (b) el dominio variable VH de la segunda cadena pesada comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, 13 y 14 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, respectivamente, y el dominio variable VL de la segunda cadena ligera comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, 16 y 17 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$ , opcionalmente en el que los dominios variables tienen las
- 50 secuencias expuestas en SEQ ID NO: 10 y 11.
5. Anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el aminoácido en la posición 124 es K (numeración según Kabat), y el aminoácido en la posición 147 es E y el aminoácido en la posición 213 es E (numeración según el índice UE de Kabat).
- 55 6. Anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que:
- el aminoácido en la posición 147 es E, y el aminoácido en la posición 213 es E (numeración según el índice EU de Kabat); y
- 60 (a) CL es una cadena ligera kappa, y el aminoácido en la posición 124 es K, y el aminoácido en la posición 123 es R (numeración según Kabat), o
- (b) CL es una cadena ligera lambda, y el aminoácido en la posición 124 es K, y el aminoácido en la posición 123 es K (numeración según Kabat).
- 65 7. Anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo biespecífico comprende además una parte Fc de IgG1 humana, en el que (i) Pro329 del Fc está sustituida por glicina o arginina

(numeración según el índice EU de Kabat); y/o (ii) Leu234 está sustituida por alanina y Leu235 está sustituida por alanina (numeración según el índice UE de Kabat).

5 8. Anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, **caracterizado por** ser del constructo Fab-ROR1 Fab - Fc - CD3 Fab - ROR1 Fab.

9. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende las etapas de

10 a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,  
b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y  
c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

15 10. Célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

11. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20



Fig. 1.

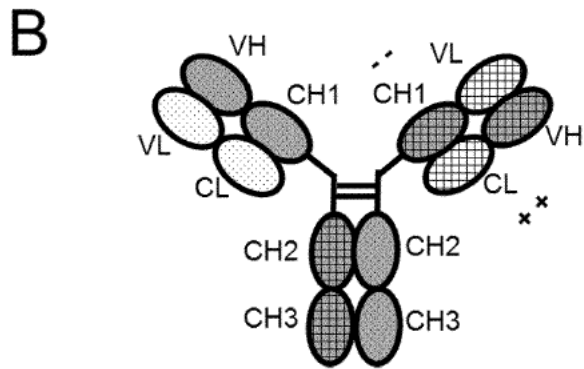
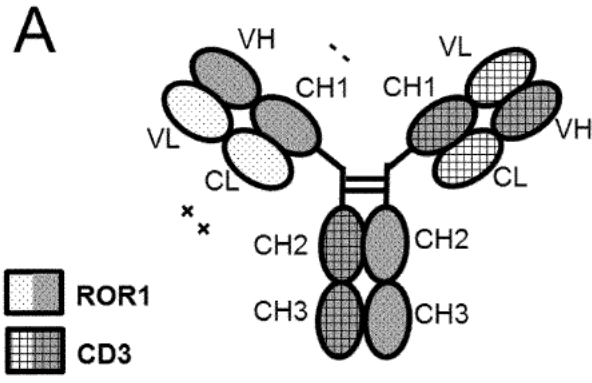


Fig. 1.

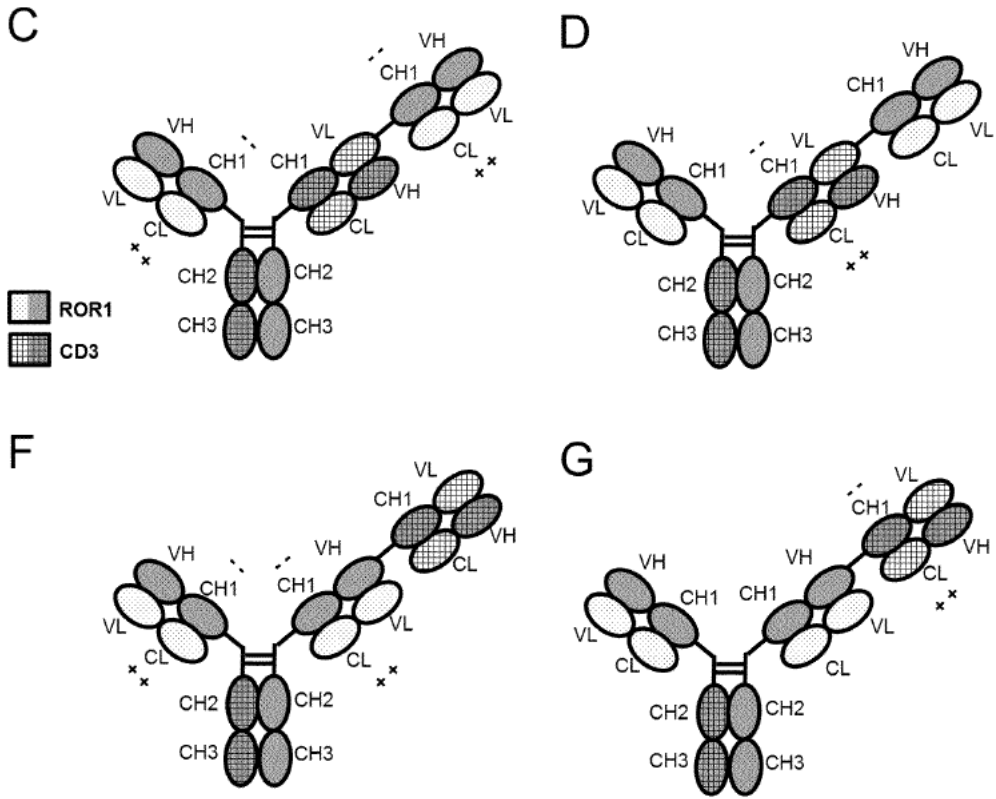
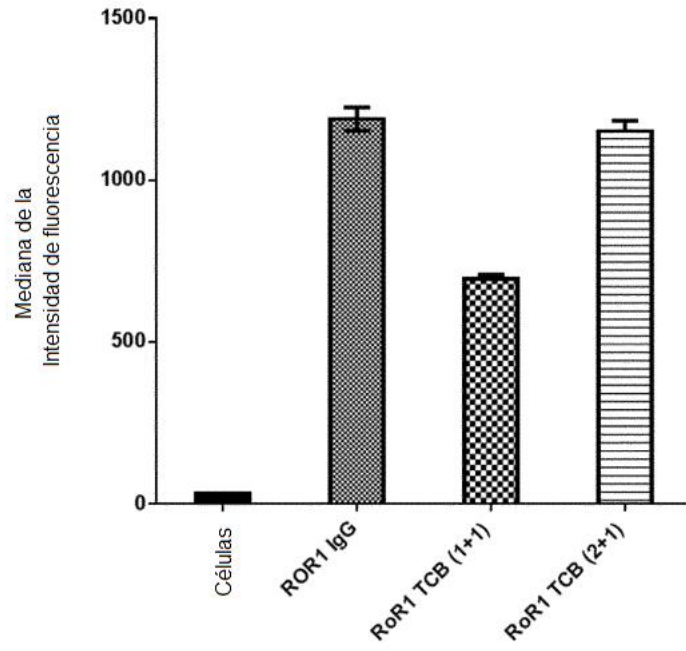




Fig. 2.

A.



B.

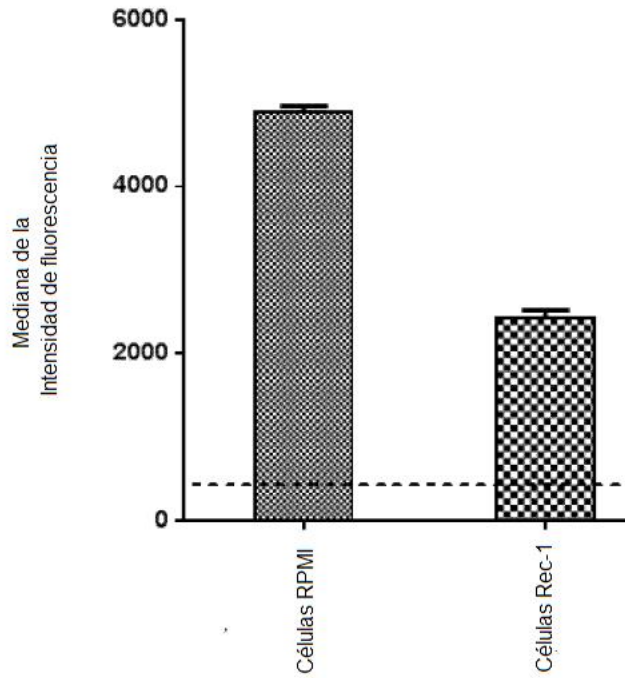


Fig. 3.

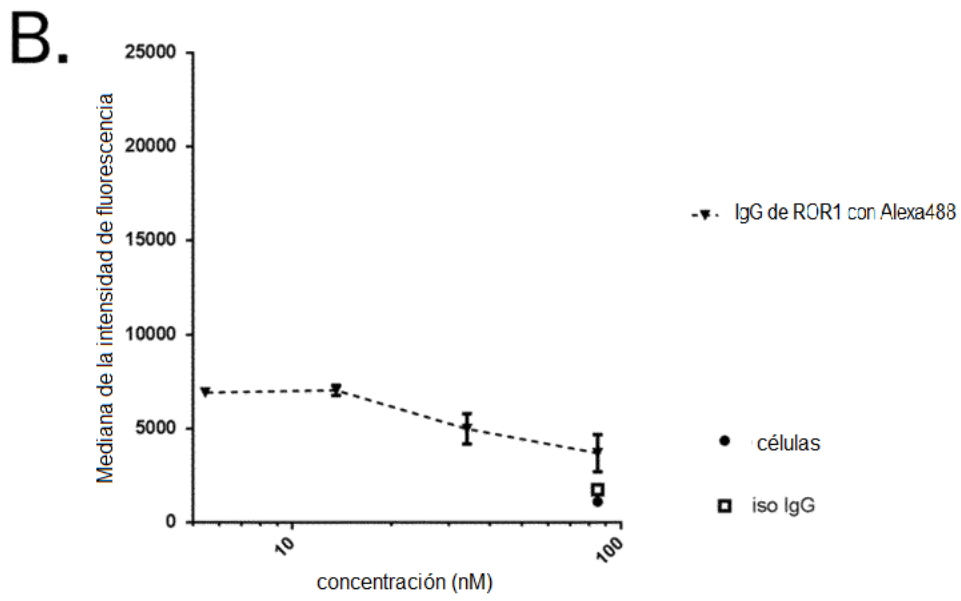
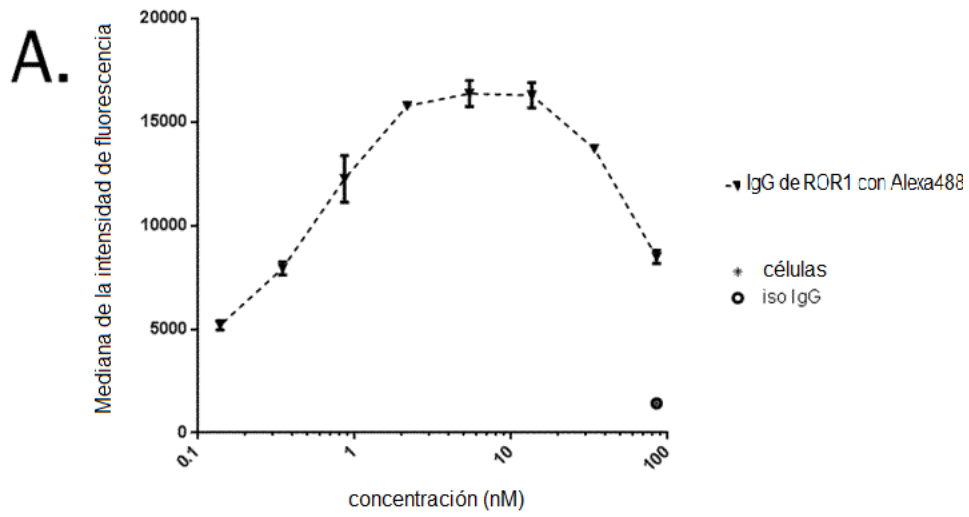
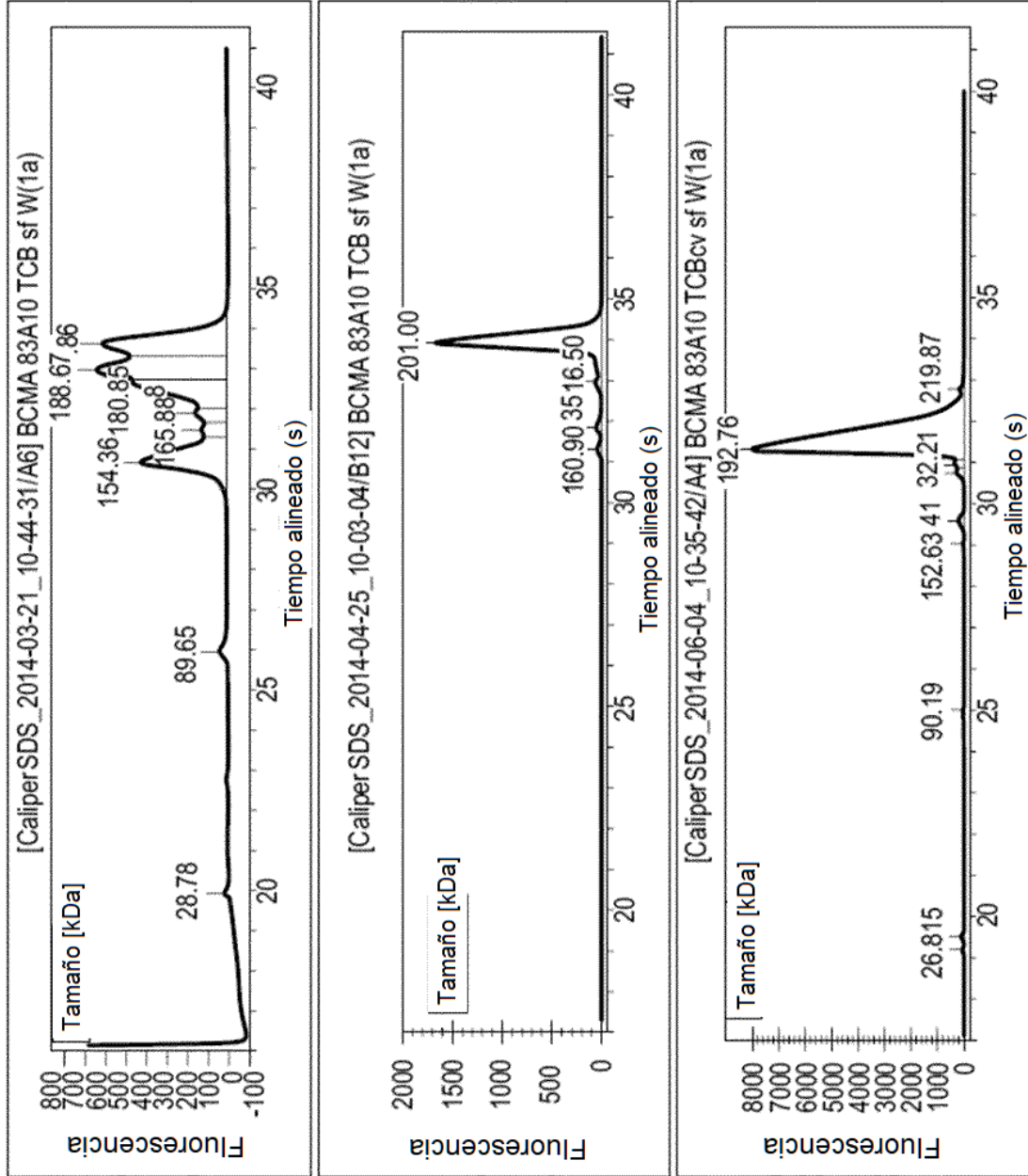


Fig. 3-1.



**A. 83A10-TCB**

Métodos de purif.: PA + SEC  
 Pureza : <30%  
 Rendimiento : 6.7 mg/L  
 Cantidad : 2.7 mg  
 Monómero : 82.8%

**B. 83A10-TCB**

Métodos de purif.: PA + SEC +  
 cIEX + re-SEC  
 Pureza : 93.4%  
 Rendimiento : 0.42 mg/L  
 Cantidad : 0.168 mg  
 Monómero : 82.8%

**C. 83A10-TCBcv**

Métodos de purif.: PA + cIEX +  
 SEC  
 Pureza : 95.3%  
 Rendimiento : 3.3 mg/L  
 Cantidad : 1.3 mg  
 Monómero : 100%

Fig. 3-2.

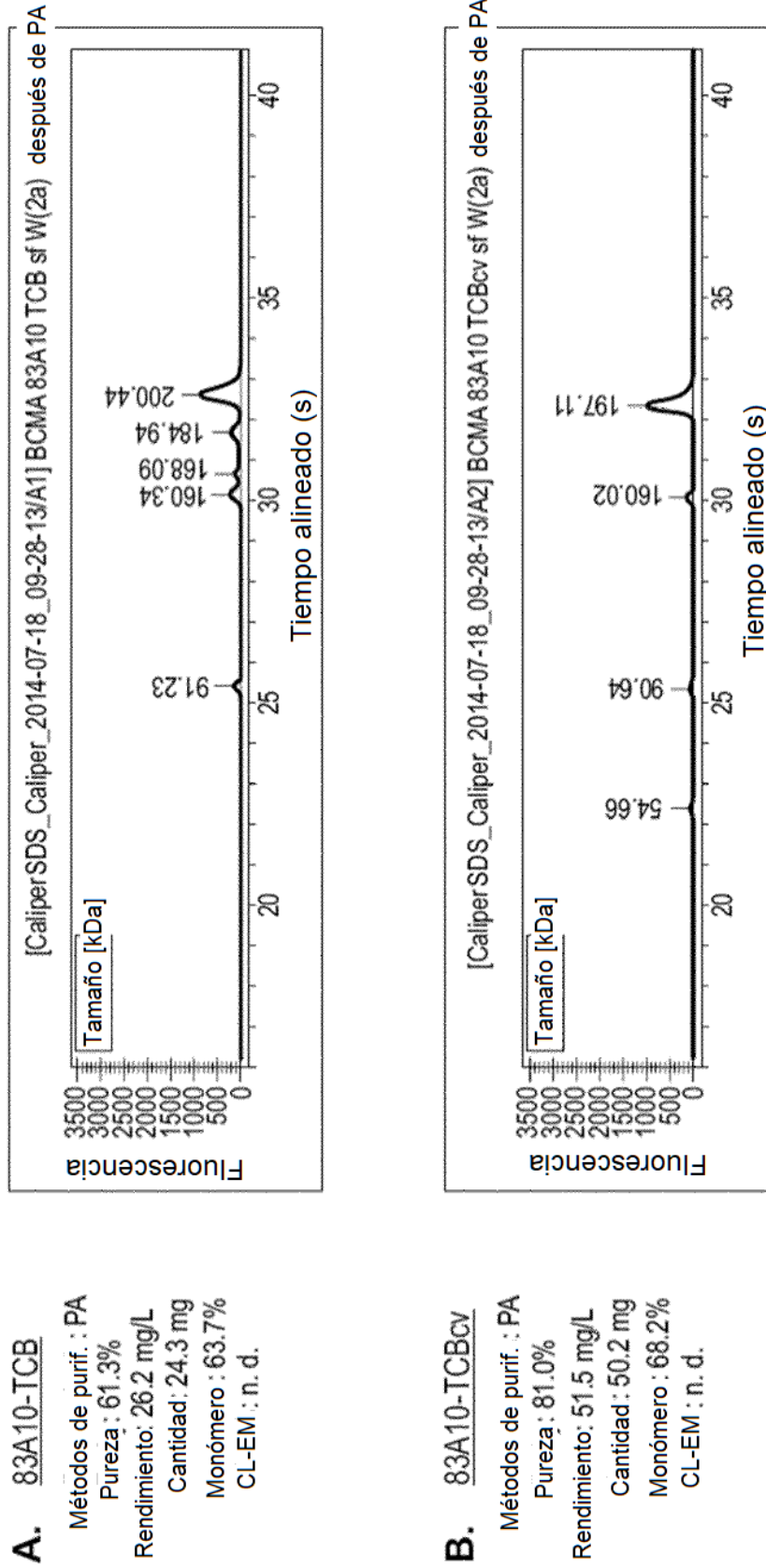


Fig. 3-2.

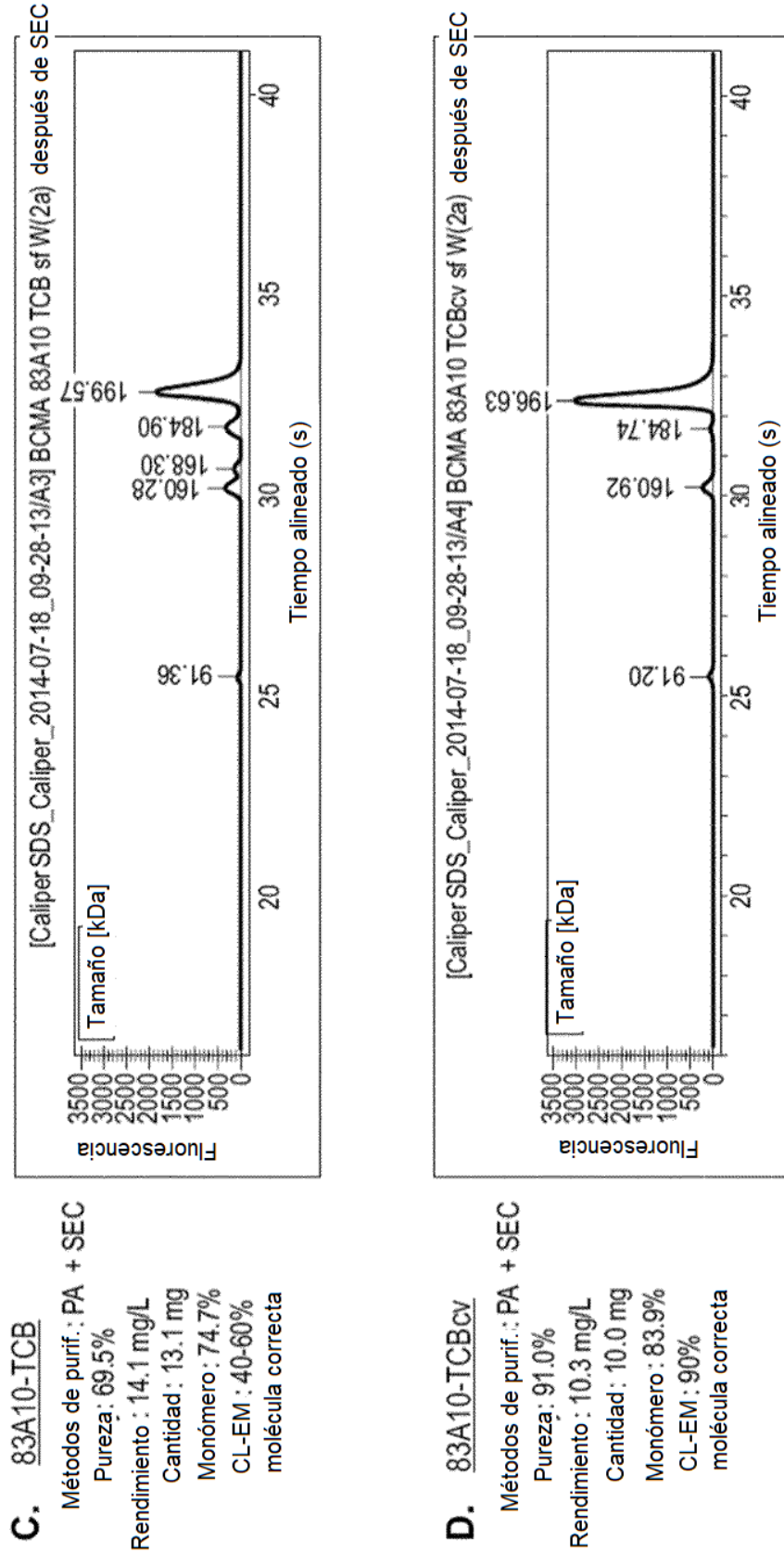
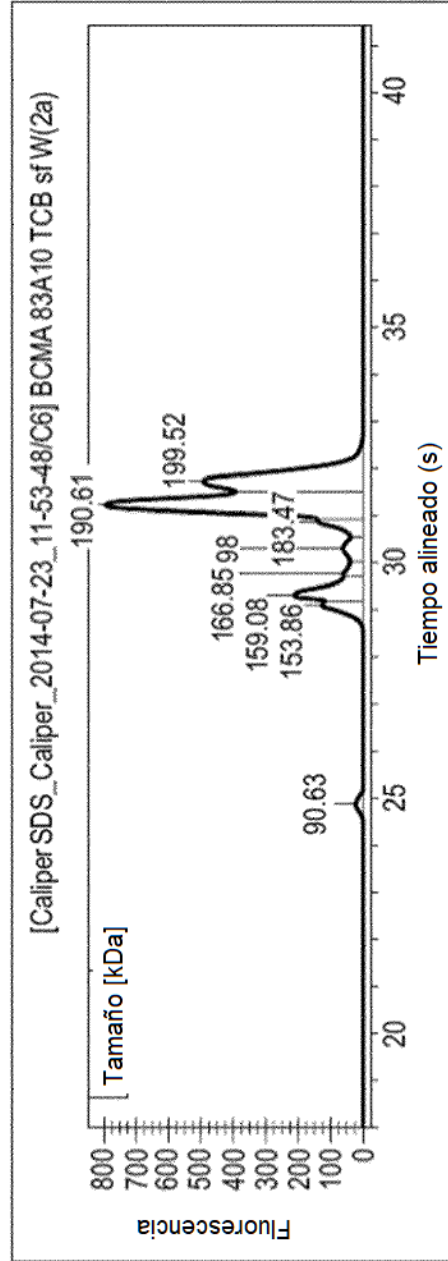
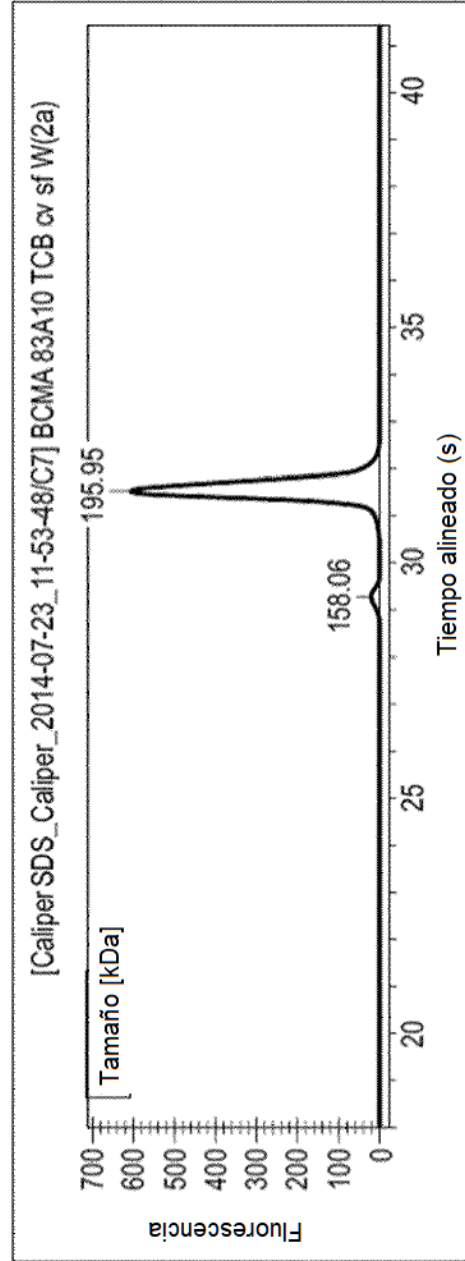




Fig. 3-2.



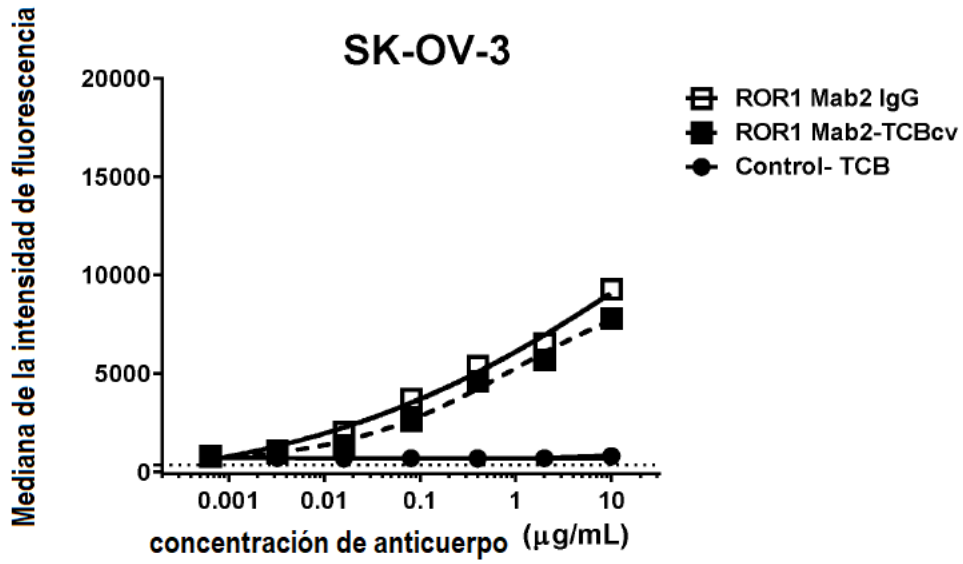
**E. 83A10-TCB**  
 métodos de purif.: [(PA + SEC  
 +(PA)] + cIEX + SEC  
 Pureza : 43.1%  
 Rendimiento: 0.43 mg/L  
 Cantidad : 0.73 mg  
 Monómero : 98.3%  
 CL-EM : 60-70%  
 molécula correcta



**F. 83A10-TCBcv**  
 métodos de purif.: [(PA + SEC  
 +(PA)] + cIEX + SEC  
 Pureza : 96.2%  
 Rendimiento: 0.64 mg/L  
 Cantidad : 1.27 mg  
 Monómero : 98.9%  
 CL-EM : >95%  
 molécula correcta

Fig. 3-3.

A.



B.

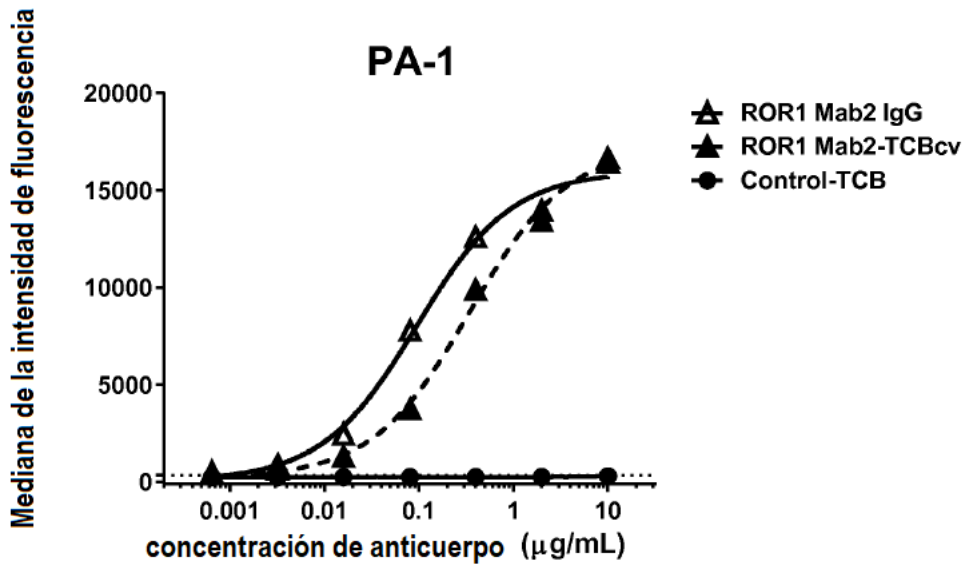


Fig. 3-4.

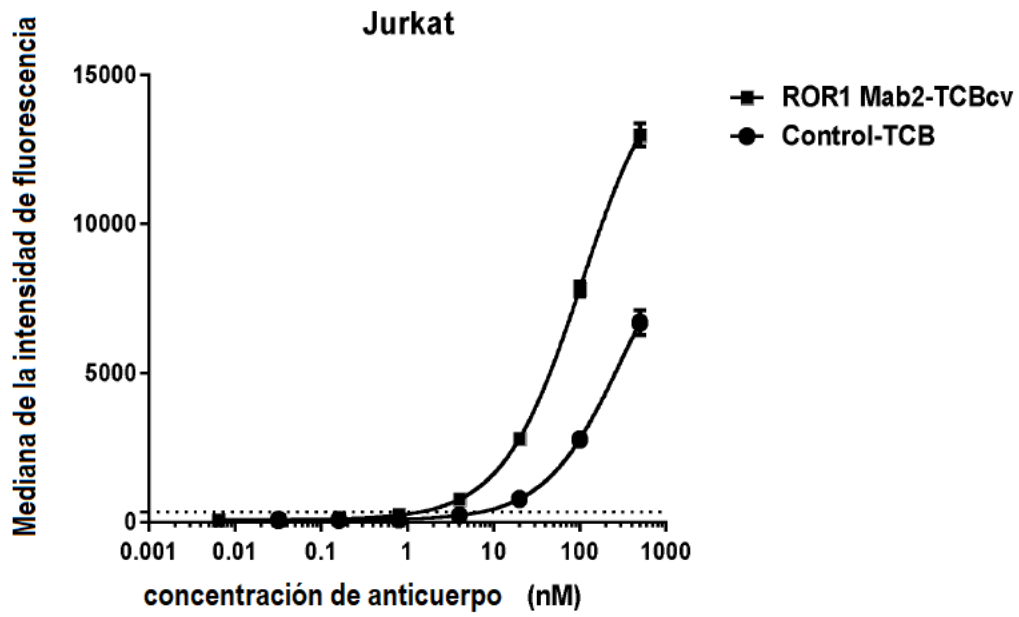


Fig. 4.

A.

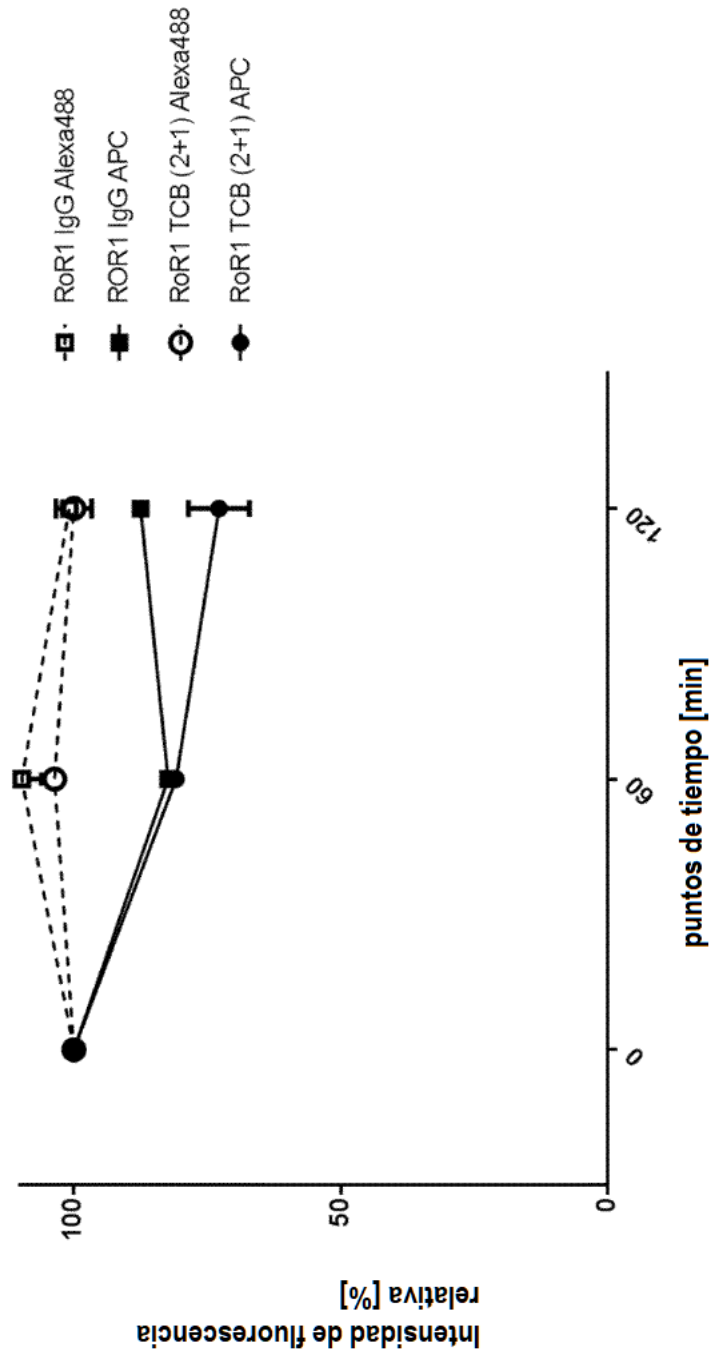
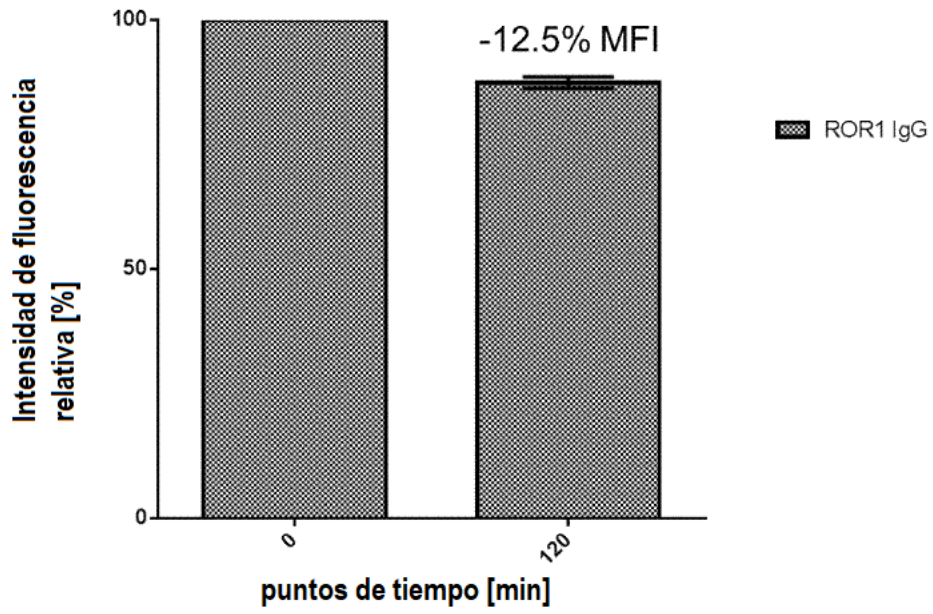
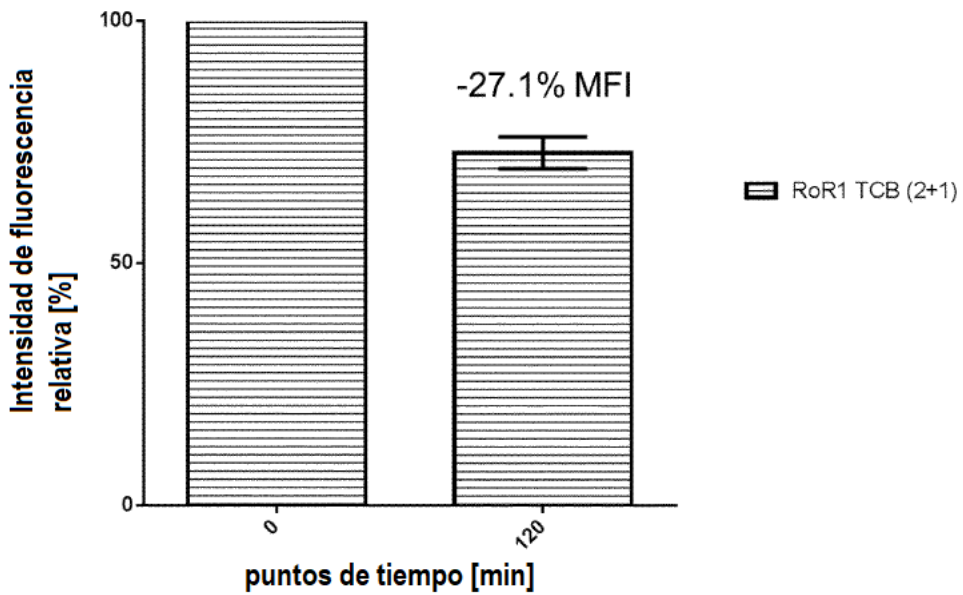


Fig. 4.

B.



C.



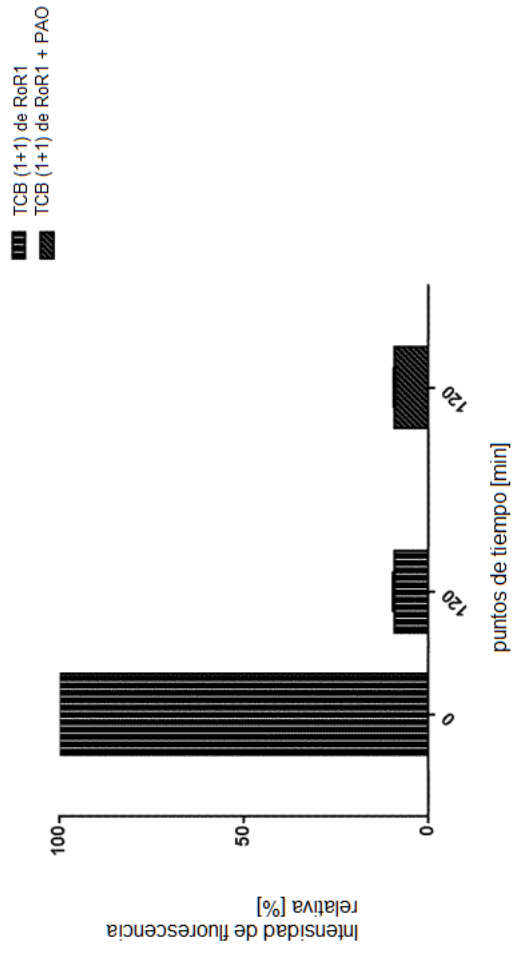


Fig. 5.

Fig. 6.

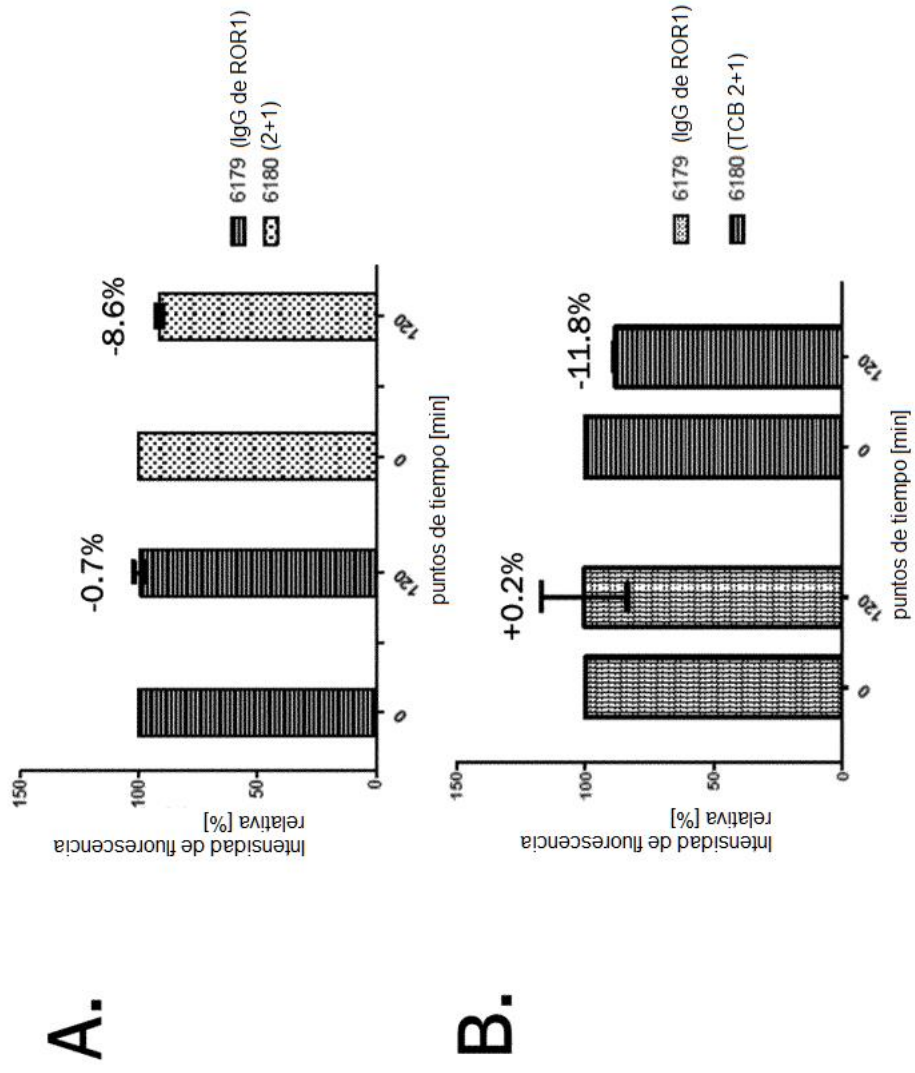


Fig. 7

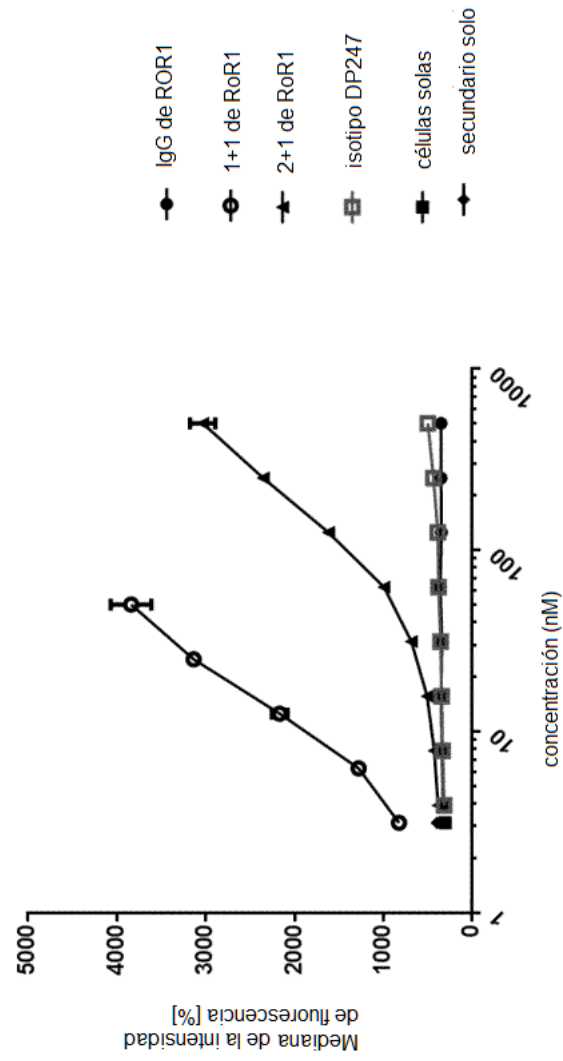




Fig. 8.

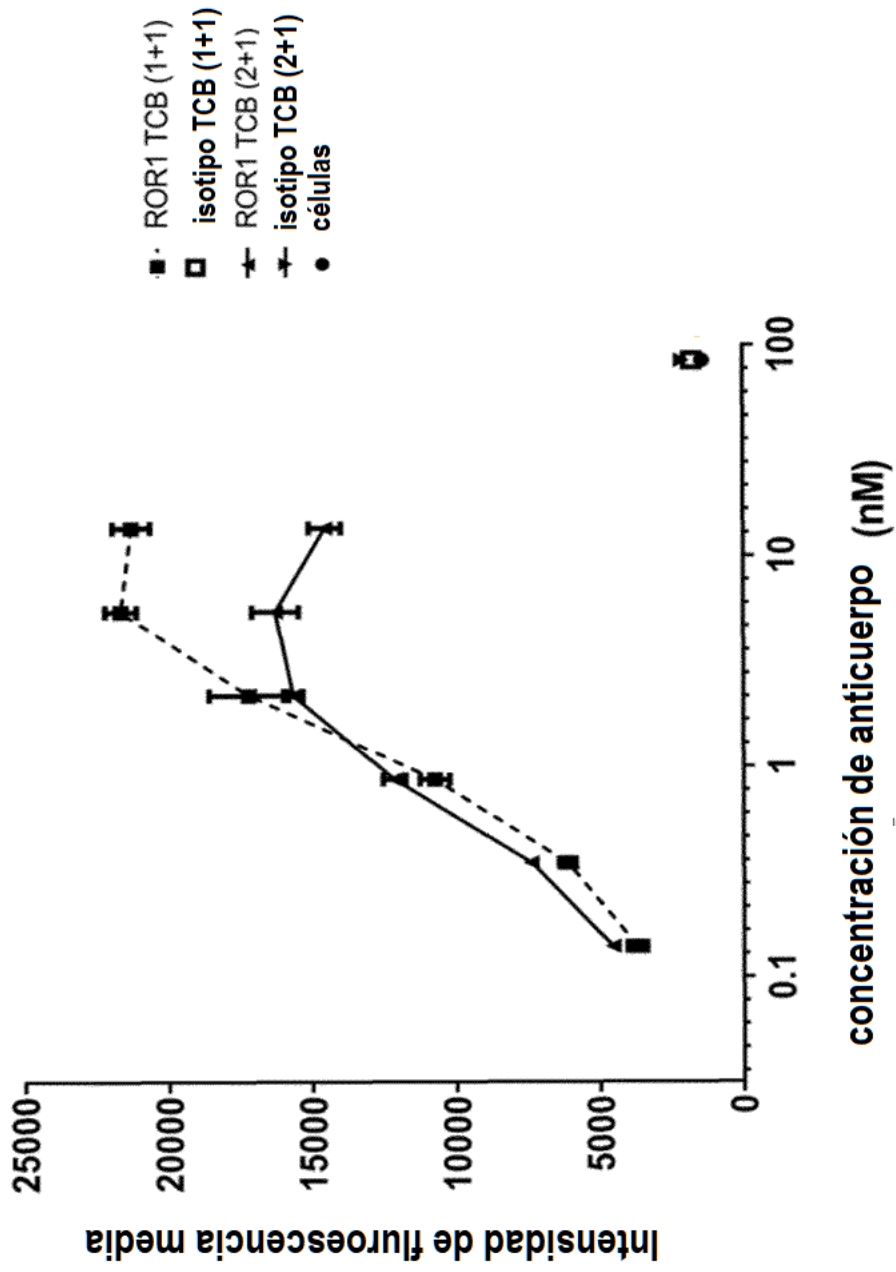


Fig. 9.

A.

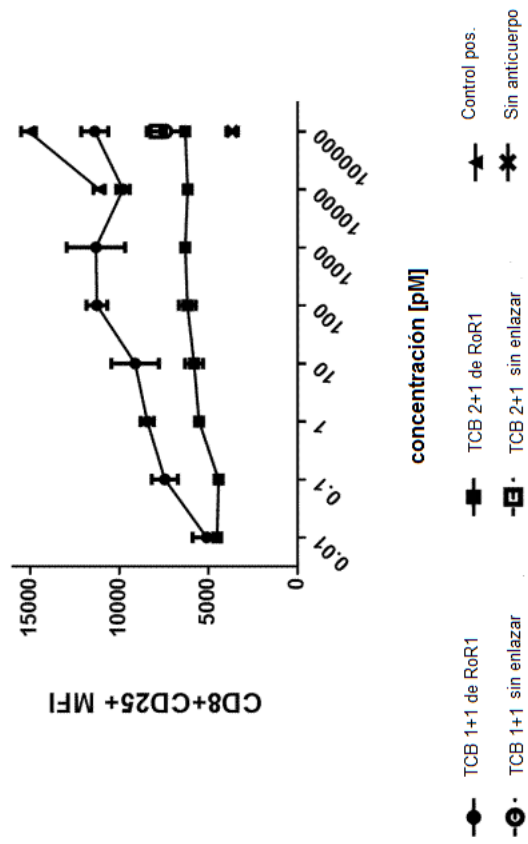


Fig. 9.

B.

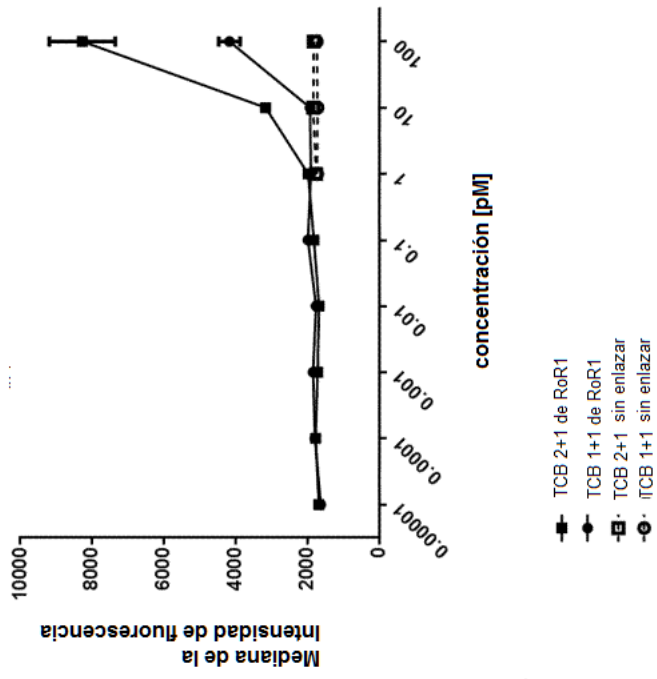
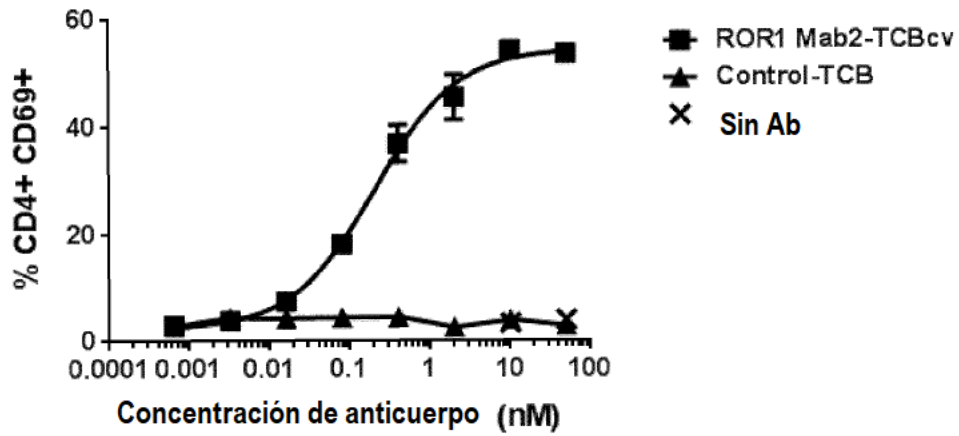


Fig. 9-1

A.



B.

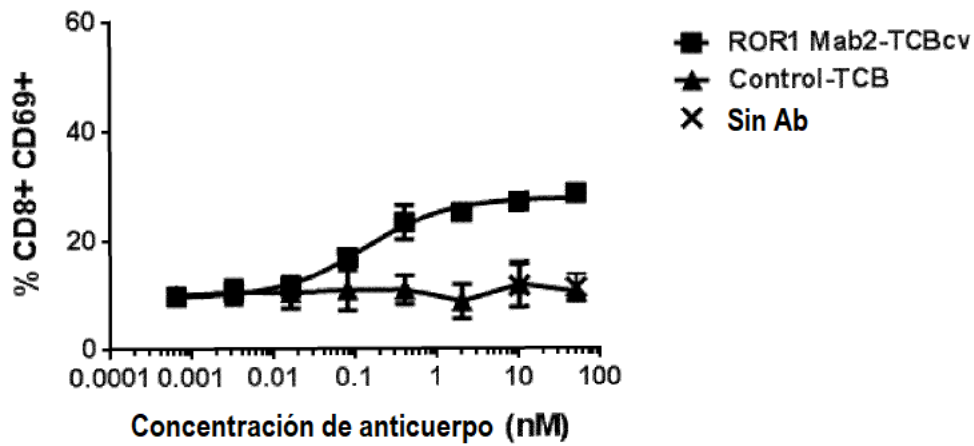
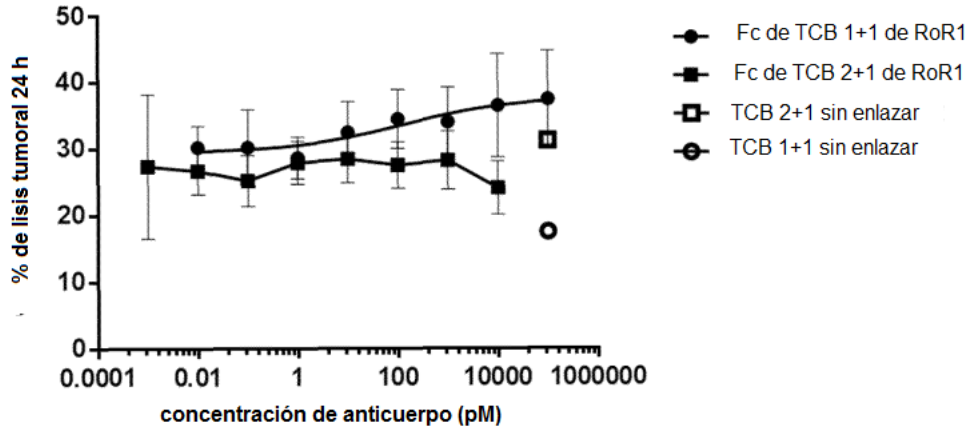


Fig. 10.

A.



B.

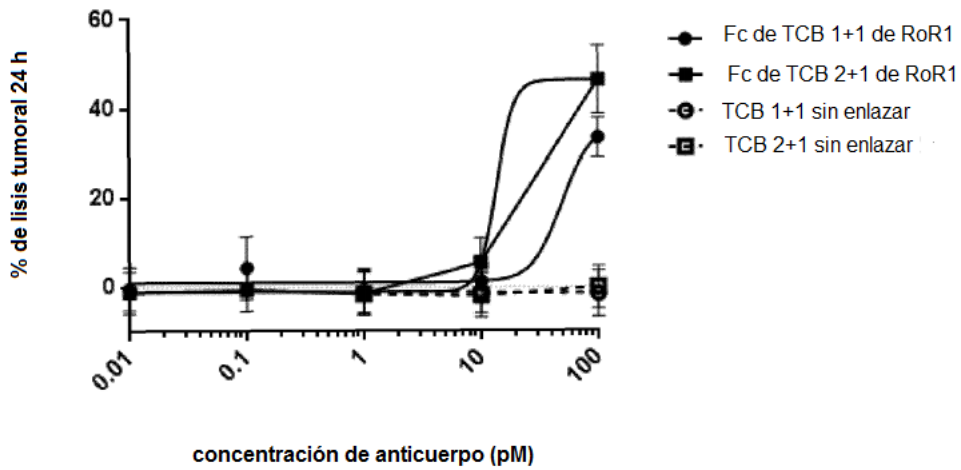
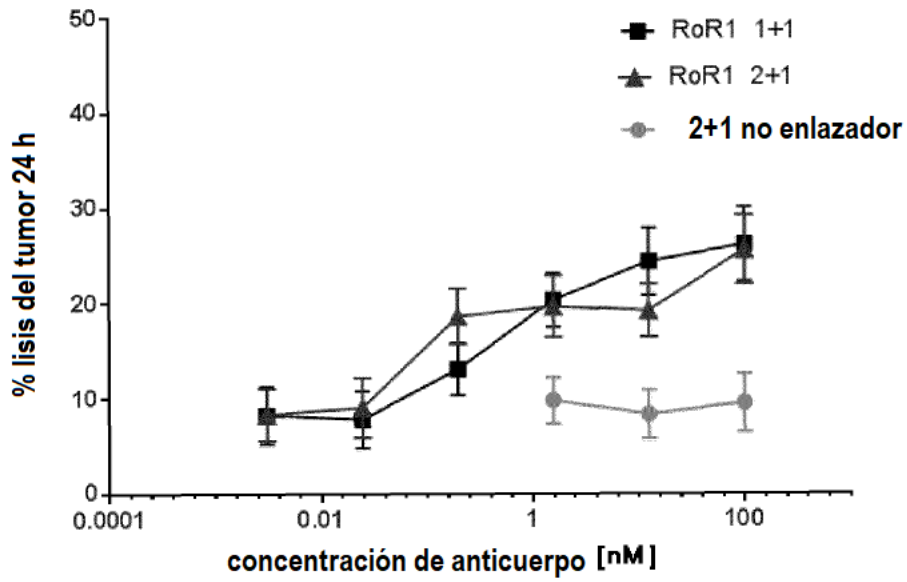


Fig. 11.

A.



B.

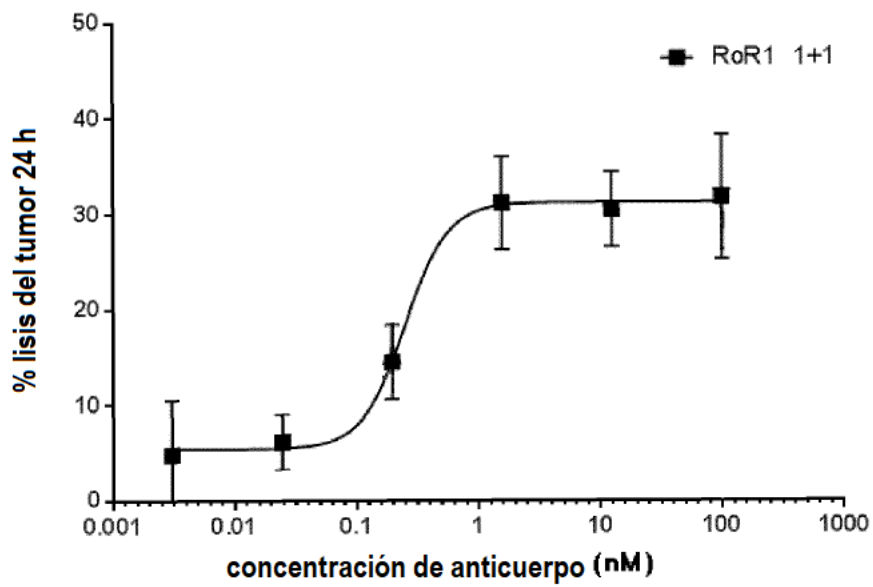
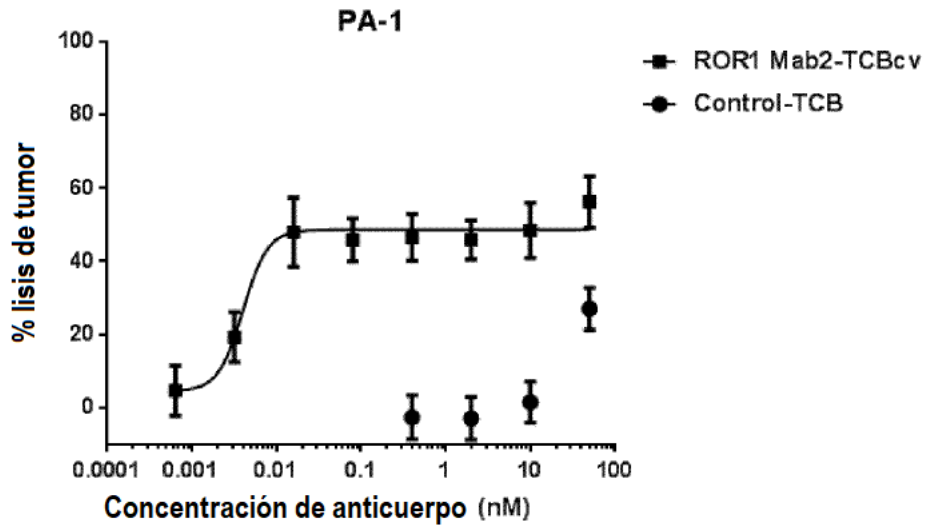


Fig. 12.

A.



B.

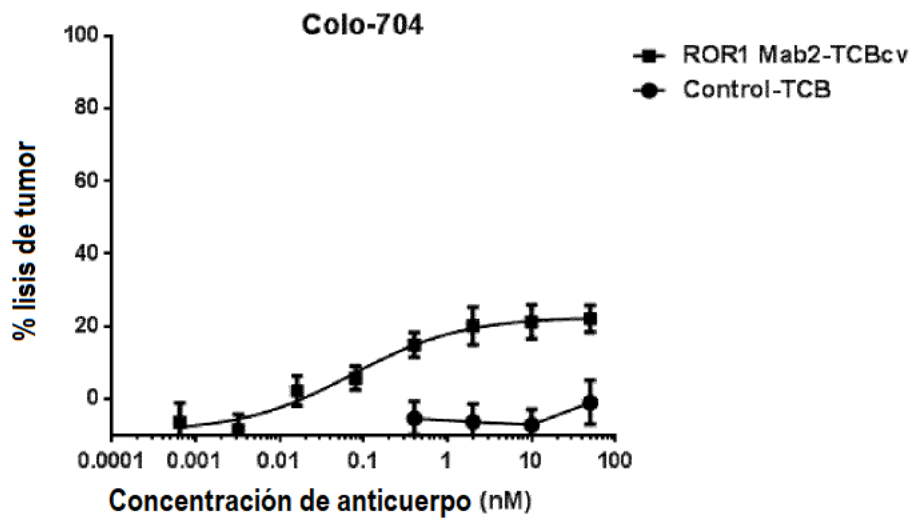
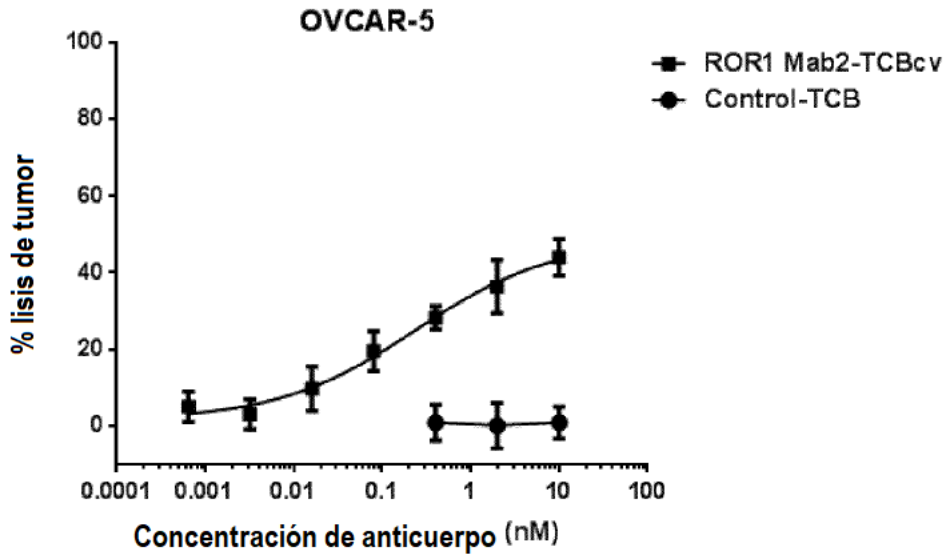


Fig. 12.

C.



D.

