(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 386 367**

(51) Int. Cl.:
***C07K 16/30*** (2006.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)
***A61K 39/395*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06737748 .1**
(96) Fecha de presentación: **09.03.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1861425**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

(54) Título: **Anticuerpos anti-mesotelina**

(30) Prioridad:
**10.03.2005 US 660177 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**17.08.2012**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**17.08.2012**

(73) Titular/es:
**MORPHOTEK, INC.**
**210 WELSH POOL ROAD**
**EXTON, PA 19341, US**

(72) Inventor/es:
**EBEL, Wolfgang;**
**GRASSO, Luigi;**
**NICOLAIDES, Nicholas C.;**
**SASS, Philip M. y**
**ROUTHIER, Eric**

(74) Agente/Representante:
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 386 367 T3

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-mesotelina

REFERENCIA CRUZADA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 60/660.177, presentada el 10 de marzo de 2005, que se incorpora en su totalidad en la presente memoria como referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta descripción se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a la mesotelina. Los anticuerpos están internalizados por células que expresan o llevan mesotelina ("células positivas a la mesotelina") y provocan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (abreviadamente ADCC, por la expresión inglesa *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) o citotoxicidad dependiente del complemento (abreviadamente CDC, por la expresión inglesa *Complement Dependent Cytotoxicity*). Los anticuerpos de la invención son útiles para el suministro específico de agentes farmacológicos a células positivas a la mesotelina, así como para provocar una actividad inmuno-efectora en las células positivas a la mesotelina, por ejemplo, células y precursores tumorales. La invención se refiere también a polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención, a células que expresan los anticuerpos de la invención, a métodos para producir los anticuerpos de la invención, a composiciones de los anticuerpos y a kits para uso en métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales, en donde los kits comprenden los anticuerpos.

FUNDAMENTO DE LA INVENCIÓN

El cáncer de páncreas es la quinta causa principal de muerte en los EE. UU. con un índice de supervivencia en 5 años inferior al 5%. Aunque la radioterapia y la quimioterapia son los tratamientos recomendados y han gozado de cierto éxito, ningún tratamiento actual consigue una supervivencia de 2 años en pacientes con la enfermedad localmente avanzada y metastásica (Lawrence, Semin. Oncol., 22:68-71, 1995).

Una dificultad que se encuentra normalmente cuando se tratan pacientes que tienen cánceres de páncreas, así como de otro tipo con fármacos citotóxicos de moléculas pequeñas es que la citotoxina provoca toxicidad tanto en los tejidos normales como en los tejidos cancerosos. Una propuesta para obtener mayor especificidad para el tejido canceroso es el uso de anticuerpos que puedan dirigirse a antígenos específicos expresados en células cancerosas que no se expresan o lo hacen a menor nivel en las células normales. Estos antígenos diana pueden ser explotados usando anticuerpos que destruyan específicamente las células tumorales que llevan el antígeno por una variedad de mecanismos que incluyen la inhibición de la actividad biológica del antígeno, provocando una actividad inmuno-efectora por la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), o el suministro de inmuno- o radio-conjugados que, cuando se suministran a la célula que lleva el antígeno, destruyen específicamente la célula diana. El hallazgo de anticuerpos que puedan unirse específicamente a células tumorales que llevan antígenos y destruirlas eficazmente ha demostrado ser difícil en muchos cánceres. Esto ha sido debido en parte a la incapacidad de obtener una fuerte lisis tumoral debida bien a una falta de función inmuno-efectora o a la internalización eficaz de anticuerpos que llevan inmunotoxinas. Debido al perfil de expresión de la mesotelina en el tejido patológico, se tiene la oportunidad de obtener dianas específicas de tumores para diversos tipos de cáncer incluyendo, aunque sin limitación, cáncer de páncreas, de ovario y de pulmón y mesotelioma.

La mesotelina es una glicoproteína unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) sintetizada como un precursor de 69 kDa y procesada proteolíticamente en forma segregada en el extremo $NH_2$ de 30 kDa y en forma unida a la membrana de 40 kDa (Yamaguchi, et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:805-808). La mesotelina se expresa en gran cantidad sobre la superficie de los cánceres de páncreas, de ovario, mesoteliomas, de pulmón y algunos otros cánceres. Su expresión es limitada sobre los tejidos normales, siendo una diana potencial en la terapia contra el cáncer. (Cao, et al., Mod. Pathol. 14:2005; Hassan, et al., Clin. Cancer Res. 2004 Jun 15; 10(12 Pt 1):3937-42).

Se ha propuesto la administración de anticuerpos contra la mesotelina como una estrategia para el tratamiento del mesotelioma, así como los cánceres de páncreas, ovario y pulmón. Sin embargo, no se habían desarrollado previamente anticuerpos de longitud completa contra la mesotelina que puedan provocar un fuerte actividad inmuno-efectora e internalizarse para el suministro de conjugados tóxicos.

En 1992, Chang et al., describieron anticuerpos monoclonales que reconocían antígenos en las células del carcinoma de ovarios humano (Chang, et al., Am. J. Surg. Pathol. 1992 16:259-68). Este anticuerpo, denominado K1, se conjugó químicamente a una forma truncada de exotoxina de *Pseudomonas* y se encontró que se unía a las células positivas a la mesotelina y a las células cancerosas. Sin embargo, no fue útil como conjugado de inmunotoxinas debido a su mala capacidad de internalización. La Patente de EE.UU. No. 6.083.502 describe la mesotelina y los usos para servir como diana y diagnosticar las células positivas a la mesotelina usando el anticuerpo K1.

Posteriormente se produjeron anticuerpos monocatenarios que se unían con alta afinidad y tenían potente actividad antitumoral como conjugado sobre los tumores positivos a la mesotelina. Uno de dichos anticuerpos monocatenarios es SS1(scFv)-PE38 que tiene una alta afinidad de unión ($K_d$ de 0,7 nM) a la mesotelina. Este anticuerpo monocatenario es una forma estabilizada de Fv en la que un enlace disulfuro conecta los dominios de las cadenas ligera y pesada del Fv. Se ha demostrado que el SS1(scFv)-PE38 tiene actividad destructora de las células tumorales por internalización del complejo anticuerpo monocatenario-inmunotoxina (Hassan, et al., *Clin. Cancer Res.*, 8: 3520-6, 2002; Hassan, et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 21 : 29a, 2002). Otros grupos también han desarrollado anticuerpos que pueden unirse a la mesotelina y encontraron que la sobreexpresión de este antígeno estaba asociada a diversos cánceres (Scholler, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 Sep 28; 96(20):11531-6; Ordoñez, *Am. J. Surg. Pathol.* 27:1418-28, 2003).

La Patente de EE.UU. No. 6.809.184 describe un anticuerpo monocatenario de alta afinidad que se une a la mesotelina en un epítopo diferente al del anticuerpo K1. Se encontró que este fragmento de anticuerpo se internaliza en células positivas a la mesotelina como un fragmento monocatenario unido a una inmunotoxina. Al anticuerpo se le llamó SS1.

Se han realizado intentos para desarrollar anticuerpos inmunoconjugados que puedan dirigirse específicamente a la mesotelina con poco éxito debido a la mala internalización y/o afinidad (Hassan, et al., *J. Immunother.* 2000 Jul-Aug; 23(4):473-9). Esta falta de internalización podría ser debida a la baja afinidad o mala internalización debida a la composición del anticuerpo y/o unión al epítopo. Además, se intentó la generación del anticuerpo monoclonal (mAb) K1 como un inmunoconjugado debido a que la forma no conjugada no era citotóxica (Hassan, et al., *Clin. Cancer Res.,* 10:3937-3942, 2004).

En la presente invención se proporcionan anticuerpos *in-out* (definidos más adelante) que se pueden internalizar en células positivas a la mesotelina y provocar un efecto citotóxico por medio de la actividad inmuno-efectora. También se proporcionan composiciones para uso en terapias con anticuerpo para el cáncer, en particular para cánceres positivos a la mesotelina, por ejemplo, cánceres de páncreas, de ovario, mesotelioma y de pulmón, usando anticuerpos que provocan un fuerte actividad inmuno-efectora aunque reteniendo la capacidad de internalizarse y facilitar el suministro de toxinas a las células positivas a la mesotelina.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no está incluida en ellas se proporciona sólo como información. La invención proporciona anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 1. Como se usa en la presente memoria, " anticuerpos *in-out* " ("Ab *in-out*") se refieren a anticuerpos que pueden provocar alternativamente una actividad inmuno-efectora o internalizarse dentro de una célula que presenta un antígeno uniéndose al antígeno diana. Sin pretender vincularse a ninguna teoría particular, se cree que los Ab *in-out* se unen a la superficie celular de una célula positiva al antígeno y se internalizan después de un periodo de tiempo a menos que sean captados por células inmuno-efectoras y/o compuestos bioquímicos que son reclutados en la célula positiva al antígeno-anticuerpo. Anteriormente se describieron métodos para generar anticuerpos que son capaces de provocar un efecto inmuno-efector, tal como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), e internalizarse (Wolff, et al., *Cancer Res.* 1993 Jun 1; 53:2560-5), sin embargo, no es evidente que puedan desarrollarse anticuerpos *in-out* contra cualquier antígeno o epítopo (Kusano et al., *Anticancer Res.* 1993 Nov-Dec; 13(6A):2207-12). Los anticuerpos que pueden dirigirse a antígenos de la superficie celular que se internalizan habitualmente no siempre se internalizan al unirse al antígeno de la superficie celular (Cogliati et al., *Anticancer Res.* 11:417-21, 1991). Por otra parte, los anticuerpos que pueden dirigirse a antígenos de la superficie celular no siempre provocan una función inmuno-efectora al unirse al antígeno de la superficie celular (Niwa, et al., *Cancer Res.* 64:2127-33, 2004; Kikuchi, et al., *Leuk. Res.* 29:445-50, 2005; Scott, et al., *Cancer Immun.* Feb 22; 5:3, 2005). Con anterioridad no se habían descrito anticuerpos *in-out* que pudieran dirigirse a la mesotelina.

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos que se unen al antígeno de la superficie celular, mesotelina, y pueden, alternativamente, provocar una actividad inmuno-efectora (por ejemplo, ADCC o CDC) o internalizarse dentro del las células positivas al antígeno (mesotelina). Estos anticuerpos son útiles para terapia contra el cáncer.

La descripción proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la mesotelina, en donde los anticuerpos se distinguen de MAb K1 en que: (a) los anticuerpos se unen con mayor afinidad y/o avidez que el MAb K1; (b) los anticuerpos provocan un efecto inmuno-efector, tal como, aunque sin limitación, ADCC o CDC; y (c) alternativamente a (b), los anticuerpos se internalizan en células positivas a la mesotelina.

La descripción proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la mesotelina, en donde los anticuerpos se distinguen del SS1 en que: (a) el anticuerpo se internaliza en células positivas a la mesotelina; y (b) alternativamente, los anticuerpos provocan una actividad inmuno-efectora, tal como, aunque sin limitación, ADCC o CDC. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen con diferente afinidad y/o avidez que el SS1.

Los anticuerpos de la descripción incluyen anticuerpos quiméricos, incluyendo aunque sin limitación anticuerpos quiméricos humanos-de ratón. Los anticuerpos de la descripción pueden ser también anticuerpos humanizados. Los anticuerpos de la descripción pueden ser también anticuerpos totalmente humanos. La invención proporciona también: células hibridoma que expresan los anticuerpos de la invención; polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención; vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención; y células de expresión que comprenden los vectores de la invención, denominadas transfectomas.

La descripción proporciona también métodos para producir anticuerpos de la invención. En algunas realizaciones, los métodos implican una etapa para cultivar una célula transfectoma o hibridoma que expresa un anticuerpo de la invención. Las células que producen anticuerpos de la invención pueden ser células de bacterias, levaduras, insectos o animales y preferiblemente son células de mamíferos.

La descripción proporciona además métodos para inhibir el crecimiento de células positivas a la mesotelina, tales como, aunque sin limitación, células tumorales o displásicas asociadas a una mayor expresión de mesotelina que las células normales, que comprende administrar a un sujeto con dichas células una composición que comprende un anticuerpo *in-out* de la invención. Los métodos se pueden aplicar para diversos estados malignos o displásicos, tales como, aunque sin limitación, mesotelioma y cáncer de páncreas, de ovario y de pulmón. En realizaciones preferidas, los sujetos son animales. En realizaciones más preferidas, los sujetos son mamíferos. En una realización más preferida, los sujetos son seres humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos se conjugan con uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como, aunque sin limitación, radionúclidos, toxinas y agentes citotóxicos y citostáticos. En otras realizaciones, los anticuerpos se usan en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Los anticuerpos *in-out* se pueden administrar como un solo agente, como un anticuerpo conjugado o no conjugado o en combinación con las formas conjugadas o no conjugadas u otro agente terapéutico.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la descripción detallada y de los ejemplos siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los resultados del análisis por FACS de la unión de MSAb-1 a células que expresan la mesotelina (células de ovario OVCAR-3 y de páncreas PANC1) aunque no se observa unión a las células A549. Estos datos fueron confirmados por análisis de transferencia de Western (no mostrado).

La Figura 2 demuestra que MSAb-1 provoca una fuerte actividad de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La línea de células tumorales OVCAR-3 (tomada como diana) que expresa la mesotelina se incubó con linfocitos de sangre periférica (PBL) humanos solos (sin pista de Ab); con MSAb-1 y PBL; o con Ig de control y PBL (IgG normal). Se analizó la capacidad de destrucción de los cultivos celulares controlando la liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH) que tiene lugar en la lisis celular. Como se muestra en la presente memoria, el MSAb-1 tiene actividad de ADCC en las células que expresan la mesotelina.

La Figura 3 demuestra que el MSAb-1 se internaliza en células que expresan la mesotelina. La Figura 3 muestra la capacidad del MSAb-1 unido a la saporina (triángulos) para destruir células en contraste con el MSAb-1 no conjugado (X) mientras que un anticuerpo isotípico de control ML1 no destruía células en forma de toxinas conjugadas ni no conjugadas (rombo y cuadrado, respectivamente). Como control, se usaron células que no expresan la mesotelina. La toxina MSAb-1 conjugado no tiene efecto tóxico en forma conjugada ni no conjugada sobre las células de control. Estos datos confirman los hallazgos de que el MSAb-1 se internaliza en células que expresan la mesotelina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información no incluida en dichas reivindicaciones se proporciona sólo como información.

Los trabajos, patentes, solicitudes de patente y bibliografía científica de referencia, incluyendo los números de acceso a las secuencias de la base de datos del GenBank que se citan en la presente memoria establecen el conocimiento de los expertos en la técnica. Cualquier conflicto entre cualquier referencia aquí citada y las enseñanzas específicas de esta memoria se resolverán en favor de esta última. Igualmente, cualquier conflicto entre una definición sobreentendida en la técnica de una palabra o una frase y una definición de la palabra o la frase dada específicamente en esta memoria se resolverá en favor de esta última.

Las obras de referencia típicas que describen los principios generales de la tecnología de DNA recombinante conocidas por los expertos en la técnica están incluidas en Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, *John Wiley & Sons*, New York (1998); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2D ED., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview, New York (1989); Kaufman et al., Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, *CRC Press, Boca Raton* (1995); McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, *IRL Press*, Oxford (1991).

Debe entenderse que esta descripción no se limita a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares que, naturalmente, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria tiene como finalidad describir sólo realizaciones particulares y no pretende limitarlas. Como se usa en esta memoria y en las reivindicaciones que se acompañan, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las formas en plural salvo que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

Cada intervalo citado en la presente memoria incluye todas las combinaciones y sub-combinaciones de intervalos, así como los números específicos contenidos en ellos.

El término "aproximadamente" como se usa en la presente memoria cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, se entiende que abarca variaciones de ±20% o ±10%, más preferiblemente ±5%, incluso más preferiblemente ±1%, y todavía más preferiblemente ±0,1% del valor específico, siendo dichas variaciones apropiadas para realizar los métodos descritos.

La invención proporciona métodos para disminuir o inhibir el crecimiento de células positivas a la mesotelina (por ejemplo, células cancerosas) y la progresión de enfermedades neoplásicas usando anticuerpos monoclonales *in-out* que se unen específicamente a la mesotelina. Los métodos de la invención se pueden usar para modular el crecimiento de células positivas a la mesotelina y la progresión del cáncer en mamíferos, incluyendo los seres humanos. Las células positivas a la mesotelina que pueden ser inhibidas incluyen todas las células cancerosas que tienen una mayor expresión de mesotelina que los tejidos humanos normales, por ejemplo aunque sin limitación, las células de cáncer de páncreas, cáncer de ovario, mesotelioma y cáncer de pulmón.

Sin pretender vincularse a ninguna teoría de actuación particular, se cree que la mayor expresión de la mesotelina en las células cancerosas da como resultado una mayor expresión en la superficie celular de la forma unida a la membrana sobre la superficie de las células. Por consiguiente, las células cancerosas tienen una mayor expresión de mesotelina que los tejidos normales. Así, la mesotelina unida a la membrana es una diana ideal para la terapia de cáncer con anticuerpos *in-out*.

Como se usa en la presente memoria, el término "epítopo" se refiere a la porción de un antígeno a la que se une específicamente un anticuerpo monoclonal e incluye, por ejemplo, epítopos conformacionales.

Como se usa en la presente memoria, la expresión " epítopo conformacional" se refiere a un epítopo discontinuo formado por una relación espacial entre los aminoácidos de un antígeno distintos de una serie de aminoácidos continua o no interrumpida.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "actividad inmuno-efectora" se refiere a un anticuerpo que puede destruir células por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo *in-out*" se refiere a un anticuerpo que puede, alternativamente, provocar una actividad inmuno-efectora o internalizarse dentro de la célula uniéndose a un antígeno diana.

Como se usa en la presente memoria, el término "alternativamente" cuando se refiere a la capacidad de un anticuerpo a internalizarse o provocar una actividad inmuno-efectora significa que el anticuerpo tiene la capacidad tanto de internalizarse como de provocar una actividad inmuno-efectora pero no pueden hacer ambas cosas simultáneamente.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibición *in vitro* del crecimiento de células displásicas" significa una disminución en el número de células tumorales en cultivo en alrededor de 5%, preferiblemente alrededor de 10%, más preferiblemente alrededor de 20%, más preferiblemente alrededor de 30%, más preferiblemente alrededor de 40%, más preferiblemente alrededor de 50%, más preferiblemente alrededor de 60%, más preferiblemente alrededor de 70%, más preferiblemente alrededor de 80%, más preferiblemente alrededor de 90% y más preferiblemente alrededor de 100%. La inhibición *in vitro* del crecimiento de células tumorales se puede medir por ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo, el ensayo en agar-agar blando de células GEO.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibición *in vivo* del crecimiento de células displásicas" significa una disminución en el número de células tumorales, en un animal, en alrededor de 5%, preferiblemente alrededor de 10%, más preferiblemente alrededor de 20%, más preferiblemente alrededor de 30%, más preferiblemente alrededor de 40%, más preferiblemente alrededor de 50%, más preferiblemente alrededor de 60%, más preferiblemente alrededor de 70%, más preferiblemente alrededor de 80%, más preferiblemente alrededor de 90% y lo más preferiblemente alrededor de 100%. La modulación *in vivo* del crecimiento de células tumorales se puede medir por ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo aunque sin limitación, utilizando los parámetros de los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST, por la expresión inglesa *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) (disponibles en línea en el *National Cancer Institute Cancer Therapy Evaluation Program*).

Como se usa en la presente memoria, "células displásicas" se refiere a células que presentan propiedades de crecimiento anómalo, tales como, aunque sin limitación, crecimiento en agar-agar blando, falta de inhibición por contacto, incapacidad para poder detener el ciclo celular en ausencia de suero y formación de tumores cuando se inyectan a ratones inmunocomprometidos. Las células displásicas incluyen, aunque sin limitación, tumores, hiperplasia y similares.

El término "evitando" se refiere a la disminución de la probabilidad de que un organismo contraiga o desarrolle un estado anómalo.

El término "tratamiento" se refiere a producir en el organismo un efecto terapéutico y aliviar o eliminar al menos parcialmente un estado anómalo del organismo. El tratamiento incluye la inhibición del crecimiento tumoral, el mantenimiento de la inhibición del crecimiento tumoral y la inducción de la remisión.

El "efecto terapéutico" se refiere a la reducción, eliminación o prevención de una enfermedad o estado anómalo, sus síntomas o sus efectos secundarios en el sujeto. La "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad necesaria para producir un efecto deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, estado o afección, es suficiente para el tratamiento de dicha enfermedad. Un efecto terapéutico alivia hasta cierto punto uno o más de los síntomas del estado anómalo. Con referencia al tratamiento de estados anómalos, un efecto terapéutico puede aludir a uno o más de lo siguiente: (a) un aumento o disminución de la proliferación, crecimiento y/o diferenciación de células; (b) la inhibición *in vivo* (es decir, lentificación o detención) del crecimiento de células tumorales; (c) la potenciación de la muerte celular; (d) la inhibición de la degeneración; (e) el alivio hasta cierto punto de uno o más de los síntomas asociados al estado anómalo; y (f) la mejora de la función de una población de células. Los anticuerpos aquí descritos efectúan el efecto terapéutico solos o en combinación con conjugados o componentes adicionales de las composiciones de la invención.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibe la progresión del cáncer" se refiere a la actividad de un tratamiento que lentifica la modulación de una enfermedad neoplásica hacia un cáncer terminal con relación a la modulación hacia enfermedades terminales de células cancerosas no tratadas.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad neoplásica" se refiere a un estado marcado por la proliferación anómala de células de un tejido.

Como se usa en la presente memoria, el término "biomolécula" se refiere a cualquier molécula que pueda ser conjugada, coadministrada, administrada antes o después de administrar el anticuerpo, o usada de otra manera junto con el anticuerpo de la invención. Las biomoléculas incluyen, aunque sin limitación, enzimas, proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y fragmentos, homólogos, análogos o sus derivados y combinaciones. Ejemplos de biomoléculas incluyen, aunque sin limitación, interleuquina-2, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, rituxan, zevalin, herceptin, erbitux y avastin. Las biomoléculas pueden ser naturales, recombinantes o sintetizadas y se puede modificar su forma natural con, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, miristilaciones y similares. El término biomolécula como se usa en la presente memoria no se limita a las moléculas que existen en la naturaleza e incluye moléculas sintéticas que no tienen origen biológico.

Como se usa en la presente memoria, el término agente "citotóxico" o "citostático" se refiere a un agente que reduce la viabilidad o potencial proliferante de una célula. Los agentes citotóxicos o citostáticos pueden actuar en una variedad de modos para reducir la viabilidad o proliferación celular, por ejemplo, aunque sin limitación, induciendo el deterioro del DNA, induciendo la detención del ciclo celular, inhibiendo la síntesis de DNA, inhibiendo la transcripción, inhibiendo la traducción o la síntesis de proteínas, inhibiendo la división celular o induciendo la apoptosis. Como se usa en la presente memoria, la expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a agentes citotóxicos, citostáticos y antineoplásicos que preferiblemente destruyen, inhiben el crecimiento o inhiben la metástasis de células neoplásicas o interrumpen el ciclo celular de células que proliferan rápidamente. Los ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque sin limitación, radionúclidos, proteína antiviral de ombú, abrina, ricina y cada una de sus cadenas A, altretamina, actinomicina D, plicamicina, puromicina, gramicidina D, doxorubicina, colchicina, citocalasina B, ciclofosfamida, emetina, maitansina, amsacrina, cisplastino, etopósido, etopósido ortoquinona, tenipósido, daunorubicina, gemcitabina, doxorubicina, mitoxantraona, bisantreno, bleomicina, metotrexato, vindesina, adriamicina, vincristina, vinblastina, BCNU, taxol, tarceva, avastina, mitomicina, enterotoxina A de *Pseudomonas* modificada, calicheamicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida y ciertas citoquinas, tales como TNF-alfa y TNF-beta.

La expresión "variantes modificadas conservadoramente" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Respecto a las secuencias de ácidos nucleicos en particular, variantes modificadas conservadoramente se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifica cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que una alanina es especificada por un codón, el

codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondiente descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones del ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente invención que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es generalmente el único codón para la metionina y TGG, que es generalmente el único codón para el triptófano) puede ser modificado proporcionado una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita respecto al producto de expresión, pero no respecto a las secuencia sonda reales.

"Recombinante" cuando se usa refiriéndose a, por ejemplo, una célula o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o la alteración de un ácido nucleico o proteína naturales, o porque la célula procede de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que son expresados anómalamente de otro modo, sub-expresados y no expresados en absoluto.

La frase "ácido nucleico" o "secuencia de polinucleótidos" se refiere a un polímero mono- o bi-catenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas desde el extremo 5' al 3'. Los ácidos nucleicos también pueden incluir nucleótidos modificados que permiten una lectura correcta por una polimerasa y no alteran la expresión de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico, incluyendo, por ejemplo, variantes modificadas conservadoramente.

"Polipéptido," "péptido" y "proteína" se usan en la presente memoria indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un compuesto químico mimético artificial de un aminoácido que existe en la naturaleza correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos que existen en la naturaleza y polímeros de aminoácido que no existen en la naturaleza. Polipéptidos de la invención, incluyendo los anticuerpos de la invención, incluyen variantes modificadas conservadoramente. Un experto en la técnica reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones a una secuencia de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o proteínas que alteren, añadan o supriman un sólo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservadoramente" en donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas conservadoramente son además y no de forma excluyente variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteina (C), metionina (M) (33). La expresión "sustitución conservadora" incluye también el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido siempre que dicho polipéptido presente también la actividad de unión requerida.

"Aminoácido" se refiere a aminoácidos que existen en la naturaleza y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y compuestos miméticos de aminoácidos que actúan de manera similar a los aminoácidos que existen en la naturaleza. Los aminoácidos que existen en la naturaleza son lo codificados por el código genético, así como los aminoácidos que son modificados posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato y O-fosfoserina. "Análogo de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que existe en la naturaleza, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina-metil-sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales de péptidos modificadas pero que mantienen la misma estructura química básica que un aminoácido que existe en la naturaleza. "Compuesto mimético de aminoácido" se refiere a un compuesto químico que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido pero que actúa de manera similar a un aminoácido que existe en la naturaleza.

Los aminoácidos pueden ser denominados en la presente memoria por sus tres letras conocidas habitualmente o por una letra recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB (véase la Tabla 1 siguiente). Igualmente, los nucleótidos, pueden denominarse por sus códigos de una sola letra habitualmente aceptados.

TABLA 1

| SÍMBOLO 1-Letra | 3-Letras | AMINOÁCIDO |
|---|---|---|
| Y | Tyr | L-tirosina |
| G | Gly | L-glicina |
| F | Phe | L-fenilalanina |
| M | Met | L-metionina |
| A | Ala | L-alanina |
| S | Ser | L-serina |
| I | Ile | L-isoleucina |
| L | Leu | L-leucina |
| T | Thr | L-treonina |
| V | Val | L-valina |
| P | Pro | L-prolina |
| K | Lys | L-lisina |
| H | His | L-histidina |
| Q | Gln | L-glutamina |
| E | Glu | ácido L-glutámico |
| W | Trp | L-triptófano |
| R | Arg | L-arginina |
| D | Asp | ácido L- |
| N | Asn | L-asparagina |
| C | Cys | L-cisteina |

Debe advertirse que todas las secuencias de aminoácidos se representan en la presente memoria por fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha es la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxilo.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "*in vitro*" o "*ex vivo*" se refiere a un ambiente artificial y a procesos o reacciones que ocurren dentro de un ambiente artificial, por ejemplo, aunque sin limitación, a tubos de ensayo y cultivos celulares. La expresión "*in vivo*" se refiere a un ambiente natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que ocurren dentro de un ambiente natural.

"Farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y sus variaciones gramaticales, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administración a un ser humano sin la producción de efectos fisiológicos indeseables hasta un grado que prohíba la administración de la composición.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a reactivos, excipientes, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del juicio médico consolidado, son adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesivas toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación compatible con una razonable relación riesgo/beneficio. Como se ha descrito con mayor detalle en la presente memoria, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para uso en la presente invención incluyen gases, líquidos y materiales semi-sólidos y sólidos.

Excepto cuando se advierta otra cosa "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a mamíferos, tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como animales experimentales, tales como conejos, perros, gatos, ratas, ratones y otros animales. Por consiguiente, "sujeto" o "paciente" como se usa en la presente memoria significa cualquier paciente o sujeto mamífero al cual puede administrarse las composiciones de la invención. En algunas realizaciones de la presente invención, el paciente sufrirá una enfermedad infecciosa o inflamatoria. En algunas realizaciones de la presente invención, al paciente se le habrá diagnosticado cáncer. En una realización ilustrativa de la presente invención, para identificar pacientes candidatos para el tratamiento de acuerdo con la invención, se emplean métodos de cribado aceptados para determinar el estado de una enfermedad o afección existente en un sujeto o los factores de riesgo asociados con una enfermedad o afección identificada o sospechada. Estos métodos de cribado incluyen, por ejemplo, exámenes para determinar si un sujeto sufre una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria o cáncer. Estos y otros métodos habituales permiten al médico seleccionar los sujetos que necesiten terapia.

"Compuesto terapéutico" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto útil en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o afección, tal como cáncer.

"Administración concomitante", "administración concurrente" o "co-administración" como se usan en la presente memoria incluyen la administración de los agentes activos (por ejemplo, los MAb, los agentes quimioterapéuticos, las biomoléculas), conjuntamente o en combinación o uno antes o después del otro. El (los) agente(s) múltiple(s) puede(n) ser administrado(s) por la misma o diferentes vías, simultánea o secuencialmente, siempre y cuando se

administren de un modo suficiente para permitir que todos los agentes alcancen concentraciones eficaces en el sitio de acción. Un experto en la técnica no tendría dificultad en determinar el tiempo, la secuencia y las dosificaciones apropiadas de administración para los fármacos y composiciones particulares de la presente invención.

"Inmunoglobulina" o "anticuerpo" se usan ampliamente para referirse tanto a moléculas de anticuerpos como a una variedad de moléculas derivadas de anticuerpos e incluyen cualquier miembro de un grupo de glicoproteínas que se producen en los mamíferos superiores y que son componentes principales del sistema inmunitario. El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$ y Fv), siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. Una molécula de inmunoglobulina incluye dominios de unión a antígenos, cada uno de los cuales incluye las cadenas ligeras y la porción del extremo terminal de la cadena pesada, y la región Fc, que es necesaria para una variedad de funciones, tal como la fijación del complemento. Hay cinco clases de inmunoglobulinas en las que la estructura primaria de la cadena pesada, en la región Fc, determina la clase de inmunoglobulina. Específicamente, las cadenas alfa, delta, épsilon, gamma y mu corresponden a IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, respectivamente. Como se usa en la presente memoria "inmunoglobulina" o "anticuerpo" incluyen todas las sub-clases de alfa, delta, épsilon, gamma y mu y también se refieren a cualquier multímero natural (por ejemplo, IgA y IgM) o sintético de la estructura de cuatro cadenas de las inmunoglobulinas. Los anticuerpos se unen a un antígeno de forma no covalente, específica y reversible. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto las posibles mutaciones que se producen de modo natural y que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos por un solo clon de células productoras de anticuerpos. A diferencia de los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales son monoespecíficos (por ejemplo, específicos para un solo epítopo de un solo antígeno). El adjetivo modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo al ser obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no ha de entenderse que requiera la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se han de usar de acuerdo con la presente invención pueden ser preparados por el método del hibridoma descrito primeramente por Kohler et al., *Nature*, 256: 495, 1975, o pueden ser preparados por métodos de DNA recombinante. Los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar también de colecciones de anticuerpos de fagos usando, por ejemplo, las técnicas descritas en Marks et al., *J. Mol. Biol*, 222: 581-597, 1991.

Las moléculas derivadas de anticuerpos comprenden porciones de anticuerpos intactos que retienen su especificad de unión a antígenos y comprenden, por ejemplo, al menos una región variable (bien sea una región variable de cadena pesada o de cadena ligera). Las moléculas derivadas de anticuerpos, por ejemplo, incluyen moléculas tales como fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fd, fragmentos F(v), fragmentos Fabc, fragmentos Fd, fragmentos Fabc, anticuerpos Sc (anticuerpos monocatenarios), diacuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, monómeros o dímeros de cadenas pesadas, monómeros o dímeros de cadenas ligeras, dímeros que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera y similares. Están incluidas todas las clases y sub-clases de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM).

Los anticuerpos pueden ser marcados/conjugados a restos tóxicos o no tóxicos. Los restos tóxicos incluyen, por ejemplo, toxinas bacterianas, toxinas virales, radioisótopos y similares. Los anticuerpos pueden ser marcados para uso en ensayos biológicos (por ejemplo, marcadores radioisotópicos, marcadores fluorescentes) para ayudar a la detección de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser marcados/conjugados para fines de diagnóstico o terapéuticos, por ejemplo, con isótopos radiactivos que suministran la radiación directamente a un sitio deseado para las aplicaciones, tales como radioinmunoterapia (Garmestani et al., *Nucl. Med. Biol*, 28: 409, 2001), técnicas de imagen y cirugía radioinmunoguiada o marcadores que permiten la formación de imágenes *in vivo* o la detección de complejos específicos anticuerpo/antígeno. Los anticuerpos pueden ser conjugados también con toxinas para proporcionar una inmunotoxina (véase, Kreitman, RJ. *Adv. Drug Del. Rev*., 31: 53, 1998).

Con respecto a los anticuerpos, la expresión "inmunológicamente específico" se refiere a los anticuerpos que se unen a uno o más epítopos de una proteína de interés, pero que no reconocen sustancialmente ni se unen a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas biológicas antigénicas.

Anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" o "quimerizados" se refiere a anticuerpos en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o sub-clase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad.. Sci U.S.A.*, 81: 6851-6855, 1984).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de múridos) son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras sub-secuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de

una región determinante de la complementariedad (abreviadamente CDR por la expresión inglesa *Complemetary-Determining Region*) del receptor están reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tales como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de armazón o entramado (abreviadamente FR por la expresión inglesa *Framework Region*) del Fv de la inmunoglobulina humana están reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias importadas de las CDR o del armazón. Estas modificaciones se hacen para refinar más y optimizar la prestación de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol, 2: 593-596, 1992.

"Completamente humana" se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, en donde la molécula completa es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo.

"Hibridoma" se refiere al producto de una fusión celular entre un linfocito neoplásico cultivado y un linfocito B o T cebado que expresa el potencial inmunológico específico de la célula parental.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comprendido usualmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, en la práctica para los ensayos de la presente invención, los materiales y métodos preferidos son los descritos en la presente memoria. Al describir y reivindicar la presente invención se usará la siguiente terminología.

En la presente memoria se citan diversas patentes y otras publicaciones.

**Anticuerpos**

Los anticuerpos *in-out* de la descripción se unen específicamente a la mesotelina y presentan alternativamente la capacidad de inducir una actividad inmuno-efectora o la capacidad de internalizarse en células positivas a la mesotelina. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen al mismo epítopo como el mAb K1 o SS1. En otras realizaciones, los anticuerpos se unen a un epítopo distinto del que se une el mAb K1 o SS1.

Los anticuerpos adecuados para uso en el método de la descripción, incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos completamente humanos, homólogos de anticuerpos humanos, homólogos de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de una sola cadena (monocatenarios), homólogos de anticuerpos quiméricos, y monómeros o dímeros de cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos o sus mezclas. Los anticuerpos de la invención pueden incluir inmunoglobulinas intactas de cualquier isotipo incluyendo los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como sus subtipos). Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas pueden ser kappa o lambda.

Los anticuerpos *in-out* de la descripción incluyen porciones de anticuerpos intactas que retienen la especificidad de unión a antígenos, por ejemplo, los fragmentos Fab, los fragmentos Fab', los fragmentos $F(ab')_2$, los fragmentos F(v), monómeros o dímeros de cadenas pesadas, monómeros o dímeros de cadenas ligeras, dímeros que consisten en una cadena pesada y una ligera, y similares. Por tanto, los fragmentos de unión a antígenos, así como los polipéptidos dímeros o trímeros de longitud completa derivados de los anticuerpos antes descritos son por si mismos útiles para presentar actividad *in-out*.

Los anticuerpos quiméricos pueden ser producidos por tecnología de DNA recombinante en la cual todas o parte de las regiones bisagra y constantes de una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena pesada de inmunoglobulina o ambas, han sido sustituidas por las regiones correspondientes de la cadena ligera o la cadena pesada de inmunoglobulinas de otros animales. De este modo, la porción que se une al antígeno del anticuerpo monoclonal parental se injerta en la cadena principal del anticuerpo de otra especie. Una propuesta, descrita en la patente EP 0239400 de Winter et al., describe la sustitución de regiones determinantes de la complementaridad (CDR) de una especie por las de otra especie, tales como sustituir las CDR de los dominios de la región variable de la inmunoglobulina de cadenas pesada y ligera humana por las CDR de los dominios de las regiones variables de ratón. Estos anticuerpos alterados pueden ser combinados subsiguientemente con las regiones constantes de la inmunoglobulina humana para formar anticuerpos que son humanos excepto por las CDR de múridos sustituidas que son específicas para el antígeno. Se pueden encontrar métodos para injertar CDR de anticuerpos, por ejemplo en el trabajo de Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-327 y en el trabajo de Verhoeyen et al., (1988) Science 239:1534-1536.

Los anticuerpos humanizados se producen por tecnología de DNA recombinante, en la cual al menos uno de los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana que no es requerido para la unión al antígeno ha sido sustituido por el aminoácido correspondiente de una cadena ligera o pesada de una

inmunoglobulina de mamífero no humano. Por ejemplo, si la inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal de ratón, es sustituido al menos un aminoácido que no se requiera para la unión al antígeno usando el aminoácido que está presente en un anticuerpo humano correspondiente en esa posición. Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que la "humanización" del anticuerpo monoclonal inhibe la reactividad inmunológica humana contra la molécula de inmunoglobulina extraña.

Como ejemplo no limitativo, puede llevarse a cabo un método para realizar el injerto de la región determinante de la complementaridad (CDR) secuenciando las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de interés que se une al antígeno diana (por ejemplo, mesotelina) y manipulando por ingeniería genética las secuencias del DNA de la CDR e imponiendo estas secuencias de aminoácidos a las regiones V humanas correspondientes por mutagénesis dirigida al sitio. Se añaden segmentos del gen de la región constante humana del isotipo deseado y los genes con las cadenas pesada y ligera "humanizadas" se co-expresan en células de mamíferos produciendo anticuerpos humanizados solubles. Una célula expresión típica es una célula de ovario de hásmster chino (CHO). Los métodos adecuados para crear los anticuerpos quiméricos se pueden encontrar, por ejemplo, en los trabajos de Jones et al., (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann (1988) *Nature* 332:323-327; Queen et al., (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:10029; y Orlandi et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833.

Queen et al., (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 y WO 90/07861 describen la preparación de un anticuerpo humanizado. Se eligieron regiones de armazón variables humanas y de ratón por su homología óptima de secuencia de proteínas. La estructura terciaria de la región variable de múridos fue modelada por ordenador y superpuesta sobre el armazón humano homólogo para mostrar la interacción óptima de los residuos de aminoácidos con las CDR de ratón. Esto condujo al desarrollo de anticuerpos con mejor afinidad de unión para el antígeno (que disminuye típicamente al preparar anticuerpos quiméricos injertados con CDR). Las propuestas alternativas para preparar anticuerpos humanizados son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, en el trabajo de Tempest (1991) *Biotechnology* 9:266-271.

"Anticuerpos monocatenarios" se refieren a anticuerpos formados por técnicas de DNA recombinantes en los cuales los fragmentos de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina están unidos a la región Fv mediante un tramo de aminoácidos manipulado por ingeniería genética. Se conocen varios métodos para generar anticuerpos monocatenarios, incluyendo los descritos en la patente de EE.UU. nº 4.694.778; Bird (1988) *Science* 242:423-442; Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Ward et al., (1989) *Nature* 334:54454; Skerra et al., (1988) *Science* 242:1038-1041.

Los anticuerpos de la descripción incluyen derivados que están modificados, por ejemplo, por enlace covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de tal modo que el enlace covalente no impida que el anticuerpo se una a su epítopo. Ejemplos de derivados adecuados incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos y fragmentos fucosilados, anticuerpos y fragmentos glicosilados, anticuerpos y fragmentos acetilados, anticuerpos y fragmentos pegilados, anticuerpos y fragmentos fosforilados y anticuerpos y fragmentos amidados. Los anticuerpos y sus derivados de la invención pueden ser derivatizados por grupos protectores/bloqueantes conocidos, por escisión proteolítica, por unión a un ligando celular o a otras proteínas, y similares. En algunas realizaciones de la invención, al menos una cadena pesada del anticuerpo está fucosilada. En algunas realizaciones, la fucosilación está unida a N. En algunas realizaciones preferidas, al menos una cadena pesada del anticuerpo comprende un oligosacárido fucosilado unido a N.

Los anticuerpos de la descripción incluyen variantes que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazamientos de aminoácidos sencillos o múltiples que retienen las propiedades biológicas (por ejemplo, internalización, afinidad o avidez de unión, o actividad inmuno-efectora) de los anticuerpos de la invención. Los expertos pueden producir variantes que tengan sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazamientos de aminoácidos sencillos o múltiples. Estas variantes pueden incluir, entre otras: (a) variantes en las cuales uno o más residuos de aminoácidos están sustituidos con aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las cuales uno o más aminoácidos están añadidos al polipéptido o suprimidos de dicho polipéptido, (c) variantes en las cuales uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en las cuales el polipéptido está fusionado con otro péptido o polipéptido, tales como un compañero de fusión, una etiqueta de proteína u otro resto químico, que pueda conferir propiedades útiles al polipéptido, tales como, por ejemplo, un epítopo para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, un resto de biotina y similares. Los anticuerpos de la invención pueden incluir variantes en las cuales los residuos de aminoácidos de una especie están sustituidos por el residuo correspondiente de otra especie, bien sea en posiciones conservadas o bien sea en posiciones no conservadas. En otra realización, los residuos de aminoácidos en las posiciones no conservadas están sustituidos con residuos conservadores o no conservadores. Las técnicas para obtener estas variantes, incluyendo técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas, son conocidas por los expertos en la técnica. Los anticuerpos de la invención incluyen también fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento" se refiere a secuencias de polipéptidos que tienen preferiblemente una longitud de al menos aproximadamente 40, más preferiblemente al menos aproximadamente 50, más preferiblemente al menos aproximadamente 60, más preferiblemente al menos aproximadamente 70, más preferiblemente al menos aproximadamente 80, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 y más preferiblemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos, y que retienen algo de la actividad biológica o inmunológica de la secuencia de longitud completa, por ejemplo, afinidad o avidez de unión a mesotelina, capacidad de internalizarse y actividad inmuno-efectora.

La descripción abarca también completamente anticuerpos humanos, tales como los derivados de células mononucleares de sangre periférica de pacientes que tienen células cancerosas positivas a la mesotelina, por ejemplo, pacientes con cáncer de ovario, cáncer de pulmón, mesotelioma o cáncer de páncreas. Dichas células pueden ser fusionadas con células de mieloma, por ejemplo, para formar células de hibridoma que producen anticuerpos completamente humanos contra la mesotelina.

En las realizaciones preferidas de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10:

SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de MSAb-1

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMN
WVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSE
DSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de MSAb-2

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN
WVRQAPGQGLEWMGLITPYNGASSYNQKFRGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE
DTAVYYCARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de MSAb-3

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN
WVKQAPGQGLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATMTRDTSTSTVYMELSSLRSE
DTAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*.

En algunas realizaciones preferidas, la cadena pesada del anticuerpo está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 9:

SEQ. ID. NO: 1: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de MSAb-1

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
AGCCAGGTACAACTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAAC
TGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCT
TACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACATTAACT
GTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAA
GACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGAC
TACTGGGGATCCGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA
CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC

ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA
TGA

SEQ ID NO: 5: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de MSAb-2

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
AGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAAC
TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACTTATTACTCCT
TACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAGAGTCACCATGACC
AGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG
GACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGAC
TACTGGGGATCCGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA
CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA
TGA

SEQ ID NO: 9: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de MSAb-3

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
AGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAAC
TGGGTGAAGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCT
TACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACCATGACC
AGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG
GACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGAC
TACTGGGGATCCGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA
CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC

ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA
TGA.

En algunas realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención comprenden una cadena ligera que comprende una secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 12:

SEQ ID NO: 4: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de MSAb-1

MGWSCIILFLVATATGVHSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWY
QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQ
WSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO: 8: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de MSAb-2

MGWSCIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWY
QQKPGQAPRLLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ
WSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO: 12: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de MSAb-3

MGWSCIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATMTCSASSSVSYMHWY
QQKPGQAPRLLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ
WSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC*

En algunas realizaciones preferidas la cadena ligera del anticuerpo está codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11:

SEQ ID NO: 3: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de MSAb-1

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
TCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAG
AAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTAC
CAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTG
GCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAACTCTTACTCT
CTCACAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAG
TGGAGTAAGCACCCTCTCACGTTCGGATCCGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA
ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAAT

SEQ ID NO: 7: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de MSAb-2

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
AGCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA
AGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTAC
CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGACACATCCAAACTG
GCTTCTGGCGTCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG
TGGAGTAAGCACCCTCTCACGTTCGGATCCGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA
ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

SEQ ID NO: 11: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de MSAb-3

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
AGCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA
AGAGCCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTAC
CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGACACATCCAAACTG
GCTTCTGGCGTCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG
TGGAGTAAGCACCCTCTCACGTTCGGATCCGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA
ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 6 o 10 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 8 o 12. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

Los anticuerpos y sus derivados de la descripción tienen afinidades de unión que incluyen una constante de disociación ($K_d$) de menos de $1 \times 10^{-2}$. En algunas realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-3}$. En otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-4}$. En algunas realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-5}$. Incluso en otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-6}$. En otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-7}$. En otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-8}$. En otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-9}$. En otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-10}$. Incluso en otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-11}$. En algunas realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-12}$. En otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-13}$. En otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-14}$. Incluso en otras realizaciones, la $K_d$ es menor que $1 \times 10^{-15}$.

Los anticuerpos de la descripción se pueden usar solos o con (por ejemplo, co-administrados o conjugados) una biomolécula o agente quimioterapéutico, tal como un agente citotóxico o citostático. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un radionúclido, incluyendo, aunque sin limitación, plomo-212, bismuto-212, astatina-211, yodo-131, escandio-47, renio-186, renio-188, ytrio-90, yodo-123, yodo-125, bromo-77, indio-111 y núclidos

fisionables tales como boro-10 o un actínido. En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es una toxina o fármaco citotóxico, incluyendo aunque sin limitación, ricina, enterotoxina A de *Pseudomonas* modificada, calicheamicina, adriamicina, 5-fluorouracilo y similares. Los métodos de conjugación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos a dichos agentes son conocidos en la bibliografía.

Sin vincularse a ninguna teoría particular, se cree que lo anticuerpos *in-out* de la descripción son particularmente útiles para unirse a mesotelina debido a una mayor avidez del anticuerpo puesto que ambos "brazos" del anticuerpo (fragmentos Fab) se unen a moléculas separadas de mesotelina. Esto conduce a una disminución de la disociación ($K_d$) del anticuerpo y un aumento global de la afinidad observada ($K_D$). Además, los anticuerpos de esta invención se unen a epítopos que permiten la internalización del complejo anticuerpo-antígeno. Estas son especialmente buenas características para dirigirlos a tumores puesto que los anticuerpos de la invención se unirán preferiblemente al tejido tumoral que al tejido normal para atraer las células y las biomoléculas inmunitarias para la citotoxicidad y son capaces de internalizarse para la administración de agentes conjugados para el efecto terapéutico.

**Ácidos nucleicos**

[La invención incluye también ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de los anticuerpos anti-mesotelina de la invención. "Ácido nucleico" o una "molécula de ácido nucleico" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier molécula de DNA o RNA, bien sea monocatenaria o bicatenaria y, si es monocatenaria, la molécula de su secuencia complementaria en forma lineal o circular. En la descripción de las moléculas de ácido nucleico, una secuencia o estructura de una molécula de ácido nucleico particular puede ser descrita en la presente memoria de acuerdo con la convención normal de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'. En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos están "aislados". Este término, cuando se aplica a una molécula de ácido nucleico, se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de secuencias con las que está inmediatamente contigua en el genoma natural del organismo en el que se originó. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de DNA insertada en un vector, tal como un plásmido o vector viral, o integrada en el DNA genómico de una célula u organismo hospedante procariota o eucariota. Cuando se aplica a RNA, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere principalmente a una molécula de RNA codificada por una molécula de DNA aislada como se ha definido ante. Alternativamente, la expresión puede referirse una molécula de RNA que ha sido suficientemente separada de otros ácidos nucleicos con los cuales estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un ácido nucleico aislado (ya sea DNA o RNA) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos, y separada de otros componentes presentes durante su producción.

[Los ácidos nucleicos de la descripción incluyen ácidos nucleicos que tienen al menos 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% y los más preferiblemente al menos aproximadamente 98% de homología con los ácidos nucleicos de la invención. Las expresiones "similitud porcentual", "identidad porcentual" y "homología porcentual" cuando se refieren a una secuencia particular se usan como se explica en el programa informático GCG de la Universidad de Wisconsin. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen también ácidos nucleicos complementarios. En algunos casos, las secuencias serán totalmente complementarias (sin desapareamientos) cuando están alineadas. En otros casos, en las secuencias puede haber desapareamientos de hasta aproximadamente un 20%.

Los ácidos nucleicos de la descripción incluyen también fragmentos de los ácidos nucleicos de la invención. Un "fragmento" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que tiene preferiblemente una longitud de al menos aproximadamente 10 ácidos nucleicos, más preferiblemente una longitud de aproximadamente 40 ácidos nucleicos y lo más preferiblemente de aproximadamente 100 ácidos nucleicos. Un "fragmento" puede significar también un tramo de al menos aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos que contiene una o más deleciones, inserciones o sustituciones. Un "fragmento" puede significar también la secuencia codificadora completa de un gen y puede incluir regiones 5' y 3' no traducidas.

La cadena ligera del anticuerpo codificado comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 8 o 12. La cadena pesada del anticuerpo codificado comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 6 o 10. En algunas realizaciones de la invención, la cadena pesada del anticuerpo está codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 5 o 9). En algunas realizaciones de la invención, la cadena ligera del anticuerpo anti-mesotelina está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, 7 u 11. En algunas realizaciones de la invención se proporcionan ácidos nucleicos que codifican tanto una cadena pesada como una cadena ligera de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, un ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 6 o 10 y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 8 o 12.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser clonados en un vector. Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, cósmido, bácmido, fago, cromosoma artificial (BAC, YAC) o virus, en el cual puede insertarse otra secuencia o elemento genético (ya sea DNA o RNA) de modo que produzca la replicación de la secuencia o elemento unido. Un "replicón" es cualquier elemento genético, por ejemplo, un plásmido, cósmido, bácmido, fago, cromosoma artificial (BAC, YAC) o virus, que sea capaz de replicación en gran parte bajo su propio control. Un

replicón puede ser RNA o DNA y puede ser monocatenario o bicatenario. En algunas realizaciones, el vector de expresión contiene un segmento de promotor constitutivamente activo (tal como, aunque sin limitación, CMV, SV40, factor de elongación o secuencias LTR) o una secuencia de promotor inducible, tal como el vector pIND inducible de esteroides (Invitrogen), en donde puede ser regulada la expresión del ácido nucleico. Los vectores de expresión de la invención pueden comprender además secuencias reguladoras, por ejemplo, un sitio de entrada al ribosoma interno. El vector de expresión puede ser introducido en una célula, por ejemplo, por transfección.

Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención pueden ser expresados recombinantemente. Las células de expresión de la invención incluyen cualquier línea de células de expresión de insectos conocida, tal como por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda*. Las líneas de células de expresión pueden ser también líneas de células de levadura, tal como, por ejemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de expresión pueden ser también células de mamíferos tal como, por ejemplo células de ovario de hámster chino, células de riñón de crías de hámster, la línea 293 de riñón embriónico humano, líneas de células de riñón de perro normales, líneas de células de riñón de gato normales, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde, africano, células COS y células G8 de mioblastos de ratón no tumorígenas, líneas de células de fibroblastos, líneas de células de mieloma, células NIH/3T3 de ratón, células LMTK, células de ratón de Sertoli, células de carcinoma cervical humano, células de hígado de la rata búfalo, células de pulmón humano, células hepáticas humanas, células de tumor mamario de ratón, células TRI, células MRC5 y células FS4. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser introducidos en una célula, por ejemplo, por transfección. Los anticuerpos expresados recombinantemente pueden ser recuperados, por ejemplo, del medio de crecimiento de las células.

**Métodos para producir anticuerpos *in-out* para la mesotelina**

*Inmunización de animales*

La descripción proporciona también métodos para producir anticuerpos monoclonales *in-out* que se unen específicamente a la mesotelina. Los anticuerpos de la invención pueden ser producidos *in vivo* o *in vitro*. Una estrategia para generar anticuerpos contra la mesotelina implica inmunizar animales con mesotelina o células que expresen la mesotelina. Los animales así inmunizados producirán anticuerpos contra la proteína. Se conocen métodos estándares para crear anticuerpo monoclonales incluyendo, aunque sin limitación, la técnica del hibridoma (véase Kohler & Milstein, (1975) *Nature* 256:495-497); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (véase Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al., en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96).

Para la producción de anticuerpos *in vivo*, el antígeno o la célula positiva al antígeno se combina generalmente con un adyuvante para promover la inmunogenicidad. Los adyuvantes varían de acuerdo con la especie usada para la inmunización. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, adyuvante completo de Freund ("FCA"), adyuvante incompleto de Freund ("FIA"), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones), péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana ("KLH"), dinitrofenol ("DNP") y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como *Bacillus Calmette-Guerin* ("BCG") y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes son también conocidos en la técnica.

La inmunización se puede conseguir usando métodos muy conocidos. La dosis y el régimen de inmunización dependerán de la especie de mamífero inmunizado, su estado inmunitario, peso corporal y/o área superficial calculada, etc. Típicamente, se toma una muestra de suero sanguíneo de los mamíferos inmunizados y se analizan los anticuerpos anti-mesotelina usando ensayos de cribado adecuados como, por ejemplo, se describen más adelante.

La mesotelina puede ser purificada a partir de células o a partir de sistemas recombinantes usando una variedad de técnicas muy conocidas para aislar y purificar proteínas. Por ejemplo, aunque sin limitación, la mesotelina puede ser aislada basándose en el peso molecular aparente de la proteína sometiendo la proteína a electroforesis sobre SDS-PAGE y transfiriendo las proteínas a una membrana. A continuación, se puede recortar de la membrana la banda del tamaño apropiado correspondiente a la mesotelina y usarla como un agente inmunógeno en animales directamente o extrayendo o eluyendo primeramente la proteína de la membrana. Como ejemplo alternativo, la proteína puede ser aislada mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular sola o en combinación con otros medios de aislamiento y purificación. Están disponibles otros medios de purificación en textos de referencia estándares como el de Zola, MONOCLONAL ANTIBODIES: PREPARATION AND USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND ENGINEERED ANTIBODY DERIVATIVES (BASICS: FROM BACKGROUND TO BENCH) Springer-Verlag Ltd., New York, 2000; BASIC METHODS IN ANTIBODY PRODUCTION AND CHARACTERIZATION, Chapter 11, "*Antibody Purificación Methods*" Howard and Bethell, Eds., CRC Press, 2000; ANTIBODY ENGINEERING (SPRINGER LAB MANUAL), Kontermann and Dubel, Eds., Springer-Verlag, 2001.

Otra estrategia para generar anticuerpos *in-out* contra la mesotelina implica inmunizar los animales con péptidos correspondientes a las regiones de la forma de mesotelina unida a la membrana que permite la internalización de los anticuerpos que retienen una fuerte actividad inmuno-efectora. Los animales así inmunizados producirán

anticuerpos contra la proteína. Se conocen métodos estándares para crear anticuerpos monoclonales que incluyen, aunque sin limitación, la técnica del hibridoma (véase Kohler & Milstein, (1975) Nature 256:495-497); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (véase Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al. in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96).

Los esplenocitos de animales inmunizados pueden ser inmortalizados fusionando los esplenocitos (que contienen los linfocitos B productores de anticuerpos) con una línea de células inmortales, tal como una línea de mieloma. Típicamente, la línea de células de mieloma es de la misma especie que el donante de esplenocitos. En una realización, la línea células inmortales es sensible al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (medio "HAT"). En algunas realizaciones, las células de mieloma son negativas para la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV). En realizaciones preferidas, las células de mieloma son sensibles a HAT, negativas al EBV y negativas a la expresión de Ig. Puede usarse cualquier mieloma adecuado. Los hibridomas de múridos pueden ser generados usando líneas de células de mieloma de ratón (por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14). Estas líneas de mieloma de múridos están disponibles en ATCC. Estas células de mieloma se fusionan con esplenocitos donadores, en presencia de polietilenglicol ("PEG"), preferiblemente polietilenglicol de un peso molecular de 1500 ("PEG 1500"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan en medio HAT que destruye las células de mieloma no fusionadas y las improductivamente fusionadas. Los esplenocitos no fusionados mueren en un corto periodo de tiempo en cultivo. En algunas realizaciones, las células de mieloma no expresan los genes de inmunoglobulinas.

Para producir anticuerpos en cultivo o en animales se pueden usar hibridomas que produzcan un anticuerpo deseado que se detecta por ensayos de cribado, tales como los descritos más adelante. Por ejemplo, las células del hibridoma pueden ser cultivadas en un medio nutriente bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que las células de hibridoma segreguen los anticuerpos monoclonales en el medio de cultivo. Estas técnicas y los medios de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Alternativamente, las células de hibridoma pueden ser inyectadas en el peritoneo de un animal no inmunizado. Las células proliferan en la cavidad peritoneal y segregan el anticuerpo, que se acumula como fluido ascítico. El fluido ascítico puede ser retirado de la cavidad peritoneal con una jeringa como una fuente rica del anticuerpo monoclonal.

Otro método no limitante para producir anticuerpos humanos se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.789.650 que describe mamíferos transgénicos que producen anticuerpos de otra especie (por ejemplo, seres humanos) estando inactivados sus propios genes de inmunoglobulina endógenos. Los genes para los anticuerpos heterólogos están codificados por genes de inmunoglobulinas humanas. Los transgenes que contienen las regiones que codifican inmunoglobulinas no transpuestas se introducen en un animal no humano. Los animales transgénicos resultantes son capaces de transponer funcionalmente las secuencias de inmunoglobulinas transgénicas y producir un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulinas humanas. Los linfocitos B de los animales transgénicos se inmortalizan subsiguientemente por cualquiera de una variedad de métodos, que incluyen fusión con una línea de células inmortalizantes (por ejemplo, una célula de mieloma).

Los anticuerpos *in-out* contra la mesotelina se pueden preparar también *in vitro* usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aunque de ningún modo como limitación, pueden prepararse anticuerpos monoclonales completamente humanos contra la mesotelina usando esplenocitos humanos cebados *in vitro* (Boerner et al., (1991) J. Immunol. 147:86-95).

Alternativamente, por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden preparar por "clonación de repertorio" (Persson et al., (1991) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:2432-2436; y Huang and Stollar (1991) J. Immunol. Methods 141:227-236). Además, la Patente de EE.UU. Nº 5.798.230 describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos a partir de linfocitos B productores de anticuerpos B humanos que son inmortalizados por infección con un virus de Epstein-Barr que expresa el antígeno 2 nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA2). El EBNA2, requerido para la inmortalización se inactiva luego dando como resultado mayores títulos de anticuerpos.

En otra realización, los anticuerpos *in-out* contra la mesotelina se forman por inmunización *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica ("PBMC"). Esto se puede conseguir por cualquier método conocido en la técnica, tal como por ejemplo, usando los métodos descritos en la bibliografía (Zafiropoulos et al. (1997) J. Immunological Methods 200:181-190).

En algunas realizaciones de la invención, el método para la inmunización *in vitro* es suplementado con la evolución dirigida de las células de hibridoma en las cuales se introduce, un alelo dominante negativo de un gen de reparación del desapareamiento, tal como *PMS1, PMS2, PMS2-134, PMSR2, PMSR3, MLH1, MLH2, MLH3, MLH4, MLH5, MLH6, PMSL9, MSH1 y MSH2* en las células del hibridoma después de la fusión de los esplenocitos, o en las células del mieloma antes de la fusión. Las células que contienen el mutante dominante negativo llegarán a ser hipermutables y acumularán mutaciones a una tasa más alta que las células de control no transfectadas. Una mezcla de las células mutantes se puede obtener por cribado de clones que produzcan anticuerpos de mayor afinidad o que produzcan títulos más altos de anticuerpos o que simplemente crezcan más deprisa o mejor en ciertas condiciones. La técnica para generar células hipermutables usando alelos dominantes negativos de genes de reparación del desapareamientos está descrita en la Patente Nº 6.146.894, concedida el 14 de noviembre de 2000.

Alternativamente, la reparación de desapareamientos puede ser inhibida usando los inhibidores químicos de reparación de desapareamientos descritos por Nicolaides et al., en el documento de patentes WO 02/054856 "*Chemical Inhibitors of Mismatch Repair*" publicado el 18 de julio de 2002. La técnica para potenciar anticuerpos usando los alelos dominantes negativos de los genes de reparación de desapareamientos o inhibidores químicos de la reparación de desapareamientos puede ser aplicada a células de expresión de mamíferos que también expresan genes clonados de inmunoglobulinas. Las células que expresan los alelos dominantes negativos pueden ser "curadas" porque los alelos dominantes negativos pueden ser inactivados, si son inducibles, eliminados de la célula y similares, de tal modo que las células lleguen a ser genéticamente estables una vez más y ya no acumulen mutaciones a la tasa anormalmente alta.

**Cribado para determinar la especificidad de anticuerpos *in-out***

El cribado para determinar los anticuerpos *in-out* que específicamente se unen a la mesotelina puede conseguirse realizando un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en el cual se revisten placas de microtitulación con antígeno inmunizante (proteína completa o péptidos). Los anticuerpos de los clones que reaccionan positivamente pueden ser cribados adicionalmente para determinar la reactividad con un ensayo basado ELISA para la mesotelina usando placas de microtitulación revestidas con mesotelina. Los clones que produzcan anticuerpos reactivos a la mesotelina se seleccionan para posterior expansión y desarrollo. Estos anticuerpos pueden ser mostrados más tarde para la unión específica a mesotelina usando análisis por FACS.

La confirmación de la presencia de anticuerpos *in-out* reactivos con la mesotelina puede ser conseguida, por ejemplo, usando un ensayo con un inmuno-efector estándar para monitorizar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos específicos de mesotelina que exhiben actividad ADCC pueden ser conjugados luego con un fluorocromo o profármaco para monitorizar la capacidad de internalización por visualización o la toxicidad que ocurre cuando el profármaco se internaliza y libera del anticuerpo poniéndose en presencia de la toxina.

**Composiciones farmacéuticas de anticuerpos**

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica de anticuerpos anti-mesotelina de la invención. Las composiciones farmacéuticas se pueden usar para inhibir o reducir el crecimiento de células positivas a mesotelina *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las composiciones pueden ser administradas a un paciente para inhibir o reducir el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración por inyección o infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más agentes quimioterapéuticos y/o biomoléculas. En algunas realizaciones, el anticuerpo está conjugado con el agente quimioterapéutico o la biomolécula. Los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, aunque sin limitación, un radionucleótido, que incluye, aunque sin limitación, plomo-212, bismuto-212, astatina-211, yodo-131, escandio-47, renio-186, renio-188, ytrio-90, yodo-123, yodo-125, bromo-77, indio-111, y núclidos fisionables tales como boro-10 o un actínido. En otras realizaciones, el agente es una toxina o fármaco citotóxico, incluyendo aunque sin limitación, ricina, enterotoxina A de *Pseudomonas* modificada, calicheamicina, adriamicina, 5-fluorouracilo y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser formuladas con un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, PBS, solución salina (tal como solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos, tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinil-pirrolidina. Dichas preparaciones pueden ser esterilizadas, y si se desea, mezcladas con agentes auxiliares, tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influenciar la presión osmótica, tampones y colorantes. Los vehículos farmacéuticos adecuados para uso en la presente invención son conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en *Pharmaceutical Sciences* (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA).

**Kits**

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un kit para inhibir o reducir el crecimiento de células positivas a la mesotelina, por ejemplo, células tumorales, *in vitro* o *in vivo*. También se proporcionan kits para identificar la presencia de células positivas a la mesotelina *in vitro* o *in vivo*.

Los kits de la invención comprenden un anticuerpo o una composición de anticuerpos de la invención e instrucciones para usar el kit en un método para inhibir o reducir el crecimiento de células positivas a la mesotelina o en un método para identificar la presencia de células positivas a la mesotelina, por ejemplo, en una muestra biológica. El kit puede comprender al menos un reactivo quimioterapéutico. El kit puede comprender al menos una biomolécula. El kit puede comprender al menos un reactivo de diagnóstico. Un ejemplo de un reactivo de diagnóstico es un marcador detectable, por ejemplo, aunque sin limitación, un agente radiactivo, fluorescente o cromóforo (por ejemplo, $^{111}$In-DOTA). El marcador detectable puede comprender una enzima. El kit puede comprender instrucciones y/o medios para administrar el anticuerpo o composición de anticuerpos, por ejemplo, por inyección o infusión.

**Métodos para detectar una célula positiva a la mesotelina**

Los métodos de la invención incluyen métodos para detectar células positivas a la mesotelina, incluyendo aunque sin limitación, células displásicas o cancerosas que presentan la mesotelina en su superficie, tales como, aunque sin limitación, células cancerosas de ovario, páncreas, pulmón o mesotelioma. El método puede realizarse *in vitro* sobre una muestra biológica o *in vivo*. Los métodos para detectar células positivas a la mesotelina de acuerdo con la invención comprenden poner en contacto un anticuerpo anti-mesotelina de la invención con una muestra biológica o administrar el anticuerpo anti-mesotelina de la invención a un paciente, en donde el anticuerpo está marcado con un marcador detectable, por ejemplo, aunque sin limitación, un agente radiactivo, fluorescente o cromóforo (por ejemplo, $^{111}$In-DOTA), y determinar la unión del anticuerpo a las células. Las células displásicas o cancerosas asociadas con mayor expresión de mesotelina exhibirán preferiblemente una unión mayor al anticuerpo que las células normales. El marcador detectable puede ser una enzima.

**Métodos para reducir el crecimiento de células positivas a la mesotelina**

Los métodos de la invención son adecuados para uso en seres humanos y animales no humanos identificados por tener células positivas a la mesotelina, por ejemplo, sujetos identificados por tener un estado neoplásico asociado a una mayor expresión de mesotelina. Los animales no humanos que se benefician de la invención incluyen animales de compañía, animales exóticos (por ejemplo, animales de parques zoológicos) y ganado doméstico. Preferiblemente los animales no humanos son mamíferos.

La invención es adecuada para uso en un paciente humano o animal que se identifica por tener un trastorno displásico que está marcado por una mayor expresión de mesotelina en el neoplasma que la de los tejidos normales. Una vez que se identifica que un paciente necesita tratamiento de dicho estado, se puede aplicar el método de la invención para efectuar el tratamiento del estado. Los tejidos displásicos que pueden ser tratados incluyen, aunque sin limitación, de ovario, pulmón, páncreas y próstata.

Los anticuerpos *in-out* y sus derivados para uso en la invención pueden ser administrados por vía oral en cualquier forma farmacéutica aceptable, tales como cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas, soluciones o similares. Los anticuerpos y sus derivados se pueden administrar también por vía parenteral, por ejemplo, mediante las siguientes vías de administración: subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrarticular, intra-sinovial, intra-esternal, intranasal, tópica, intratecal, intrahepática, intralesional y técnicas de inyección o infusión intracraneal. Generalmente, los anticuerpos y sus derivados serán proporcionados en forma de inyección intramuscular o intravenosa.

Los anticuerpos *in-out* y sus derivados de la invención se pueden administrar solos o con un portador farmacéuticamente aceptable, incluyendo adyuvantes, vehículos y excipientes aceptables, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Las dosis eficaces dependerán de una variedad de factores y está al alcance de la experiencia de un médico experto ajustar la dosificación para un paciente dado de acuerdo con diversos parámetros, tales como el peso corporal, el objeto del tratamiento, la dosis más alta tolerada, la formulación específica usada, la vía de administración y similares. Generalmente, son adecuados niveles de dosificación entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día del anticuerpo o uno de sus derivados. En algunas realizaciones, la dosis será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día del anticuerpo o uno de sus derivados. En otras realizaciones, la dosis será de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal/día a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal/día. Incluso en otras realizaciones, la dosis será de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal/día a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día. La dosificación puede ser un bolo o una infusión. Las dosificaciones se pueden administrar una vez al día o varias veces al día. Además, las dosificaciones pueden ser administradas varias veces en un periodo de tiempo. En algunas realizaciones, las dosis se dan cada 1-14 días. En algunas realizaciones, los anticuerpos o sus derivados se dan en forma de una dosis de aproximadamente. 3 a 1 mg/kg i.p. En otras realizaciones, los anticuerpos o sus derivados se proporcionan de aproximadamente 5 a 12,5 mg/kg i.v. Incluso en otras realizaciones, los anticuerpos o sus derivados se proporciona de tal modo que se mantenga un nivel en plasma de al menos aproximadamente 1 µg/ml.

El tratamiento eficaz puede ser determinado mediante una variedad de modos. En una realización, el tratamiento eficaz se determina mediante un progreso ralentizado del crecimiento del tumor. En otras realizaciones, el tratamiento eficaz está marcado por la contracción del tumor (es decir, disminución del tamaño del tumor). En otras realizaciones, el tratamiento eficaz está marcado por la inhibición de la metástasis del tumor. Incluso en otras realizaciones, la terapia eficaz se mide por la mejora del bienestar del paciente incluyendo signos tales como ganancia de peso, fortaleza recobrada, disminución del dolor, prosperidad e indicaciones subjetivas de mejor salud por parte del paciente.

Los anticuerpos de la invención pueden ser administrados antes, después o simultáneamente con otro agente terapéutico o de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos *in-out* de la invención se pueden administrar solos o con un agente citotóxico, tales como, aunque sin limitación, adriamicina, doxorubicina, gemcitabina o 5-fluorouracilo. Los anticuerpos *in-out* de la invención pueden ser administrados solos o con un agente citostático, tales como, aunque

sin limitación, tarceva y avastin. Los anticuerpos *in-out* y sus derivados de la invención se pueden administrar solos o con un agente vacunal. Los anticuerpos *in-out* y sus derivados de la invención se pueden administrar solos o con otra biomolécula, tales como, aunque sin limitación, interleuquina-2, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, rituxan, zevalin, herceptin, erbitux y avastin.

Los anticuerpos *in-out* y sus derivados de la invención pueden ser administrados en forma de una mezcla homogénea de un anticuerpo no conjugado o conjugado o en forma de una mezcla heterogénea de un anticuerpo *in-out* no conjugado o conjugado.

Los siguientes Ejemplos se facilitan para ilustrar la presente invención, y no deben entenderse como limitativos de la misma.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1. Anticuerpos *in-out* que se pueden unir a la mesotelina**

El anticuerpo monoclonal MSAb-1 se desarrolló clonando el dominio variable de un fragmento FAb de mesotelina en la región constante de IgG1 humana. Se mostró que el anticuerpo se unía específicamente a la proteína mesotelina y a las células cancerosas que expresan mesotelina y se encontró que tenía una constante de unión de 2 nM usando BIACORE. El MSAb-2 y MSAb-3 son variantes del MSAb-1 que tienen diferentes secuencias de nucleótidos y aminoácidos en sus respectivas regiones variables. Para demonstrar la unión específica a la mesotelina, se realizaron ensayos ELISA usando mesotelina recombinante en formato de 96 pocillos siguiendo los métodos usados por los expertos en la técnica. Los anticuerpos que por ELISA se encontró que reaccionaban fueron analizados adicionalmente para determinar la unión a la mesotelina usando análisis por FACS siguiendo el protocolo de fabricante. En la Figura 1 se muestran datos representativos del análisis por FACS en los cuales las células tumorales de ovario y de páncreas que expresan mesotelina eran positivas para la unión de MSAb-1 en contraste con los linfocitos nulos (A549).

**Ejemplo 2. Actividad inmuno-efectora del MSAb-1**

La actividad del anticuerpo *in-out* MSAb-1 para la actividad inmuno-efectora se determinó por ensayos estándares de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en la línea de células OVCAR-3 que expresa la mesotelina. Descrito resumidamente, las células diana OVCAR-3 fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos de fondo plano en medio de crecimiento completo (RPMI-1640 que contenía 10% de FBS, L-glutamina 2mM). Al día siguiente, el medio completo se reemplazó por 100 µl de medio CHO-CD exento de suero (Sigma) y se añadieron a las células diana 50 µl de medio acondicionado que contenía anticuerpo y se incubó durante 20 minutos a 37ºC. Subsiguientemente, se añadieron a cada pocillo 100 µl de medio exento de suero que contenía 2 x $10^5$ células efectoras y las células se incubaron durante 5-6 horas a 37ºC, con 5% de $CO_2$. Las células efectoras procedían de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) aisladas de donantes sanos (compradas a Interstate Blood Bank). Antes de usarlas en ensayos de ADCC, las PBMC fueron activadas sembrando las PBMC a 2,5 x $10^6$/ml en RPMI completo que contenía 10 ng/ml de interleuquina-2 recombinante humana (R&D Systems) durante 3 días a 37ºC con 5% de $CO_2$. Las PBMC activadas se añadieron luego a células OVCAR-3 en una relación efector: célula diana de 5:1 y los cultivos se incubaron durante 5-6 horas a 37ºC con 5% de $CO_2$. El líquido sobrenadante se recogió luego de cada pocillo y se transfirió a placas ELISA y se analizó la actividad de ADCC como sigue. La actividad de ADCC fue monitorizada por la liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH), una enzima endógena usada para medir la ADCC en ensayos estándares. La LDH se monitorizó añadiendo 100 µl de sustrato de LDH (Roche), un producto químico que cuando es convertido por la LDH es detectable espectrofotométricamente a una $DO_{490}$, al líquido sobrenadante e incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. La actividad de LDH es proporcional a la cantidad de la enzima LDH liberada de las células diana lisadas. La densidad óptica a 490 nm ($DO_{490}$) se obtuvo espectrofotométricamente. Se añadió Triton X al 2% a las células diana solas como un control positivo "max", mientras que células diana con PBMC y sin anticuerpo sirvieron como control negativo "espontáneos". Se obtuvieron los valores de LDH y se determinó el porcentaje de citotoxicidad con la fórmula: (valor de la muestra - espontáneo) / (max - espontáneo) x 100%, en donde 'espontáneo' = lisis de células diana en ausencia de células efectoras, y 'max' = lisis de células diana en presencia de Triton al 2%. La citotoxicidad producida por 100 ng/ml de MORAb-A92 (proteína A purificada), un anticuerpo de control de isotipo, se usó como control positivo. La citotoxicidad no específica se monitorizó usando 100 ng/ml del anticuerpo IgG1 humano normal. La relación obtenida dividiendo el % de citotoxicidad por la concentración del anticuerpo para cada pocillo/clon (es decir, la relación = 50 (%)/100 (ng/ml) = 0,5) se estableció como criterio para seleccionar clones principales con función efectora potencialmente mejorada.

El análisis de MSAb-1 muestra la capacidad para potenciar la actividad de ADCC (p=0,018) en las células incubadas con la Ig de control o sin anticuerpo (Figura 2). Estos datos respaldan el hallazgo de que el MSAb-1 tiene efectos citotóxicos mediante la función inmuno-efectora.

**Ejemplo 3. Internalización del MSAb-1**

El MSAb-1 se internaliza cuando se une a células que expresan la mesotelina. Este hallazgo se muestra en la Figura 3 usando el ensayo Hum-ZAP. Segundas inmunotoxinas son conjugaciones de un anticuerpo secundario con la proteína saporina inactivadora del ribosoma. Si el anticuerpo primario que se ensaya se internaliza, la saporina es

transportada a la célula mediante su unión al anticuerpo secundario. Una vez internalizada, la saporina se separa de su conjugado con IgG, inhibe la síntesis de proteínas y finalmente causa la muerte celular. Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems, Nº del catálogo IT-22) es un conjugado químico secundario de IgG anti-humana de cabra purificada por afinidad, (peso molecular 210 kDa) que reconoce anticuerpos monoclonales humanos. La molécula de control, IgG de cabra-SAP (Advanced Targeting Systems nº de catálogo IT-19) es un conjugado de IgG de cabra normal y saporina. Descrito brevemente, las células se cultivaron en placas de cultivos de tejidos de 96 pocillos de fondo plano a 2500/pocillo en 80 µl de RPMI 1640 con 10% de FCS, glutamina 2,0 mM, piruvato sódico 1,0 mM, y MEM con aminoácidos no esenciales 0,1 mM. Veinticuatro horas más tarde, se añadieron 10 µl de anticuerpos primarios ML-1 o MSAb-1 junto con 10 µl de Hum-ZAP o IgG de cabra-SAP para llevar el volumen total hasta 100 µl. Se pusieron a punto experimentos con titulaciones de anticuerpos incluyendo anticuerpos primarios y secundarios solos como control. Cuatro días más tarde, se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo de citotoxicidad *Promega Cell Titer*(R) (nº del catálogo G3581) que lee por espectrofotometría el número de células viables. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se evaluaron comparando los pocillos tratados y no tratados y los resultados se expresan como porcentaje del control. Como se muestra en la Figura 3, las células OVCAR-3, que sobreexpresan la mesotelina (triángulos) mueren por tratamiento con MSAb-1 conjugado con toxina en comparación con el anticuerpo ML1 de control de isotipo conjugado y no conjugado con toxina (rombos y cuadrados, respectivamente) y con MSAb-1 no conjugado (X). En contraste, el MSAb-1 conjugado con toxina no tiene citotoxicidad sobre las células TP sin mesotelina en comparación con el anticuerpo conjugado con ML1 de control positivo que reconoce un antígeno de la superficie celular expresado en células TP.

**SUMARIO**

En resumen, los anticuerpos anti-mesotelina de la invención son capaces de provocar una ADCC e incluso internalizarse en células positivas a la mesotelina. Los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento de células tumorales positivas a la mesotelina bien sea como un solo agente o en terapia de combinación.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Morphotek, Inc.
Ebel, Wolfgang
Grasso, Luigi
Nicolaides, Nicholas
Sass, Philip M.
Routhier, Eric

<120> ANTICUERPOS ANTI-MESOTELINA

<130> MOR-0581

<150> US 60/660,177
<151> 2005-03-10

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 1407
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 1

```
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagccag      60
gtacaactgc agcagtctgg gcctgagctg gagaagcctg gcgcttcagt gaagatatcc     120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacaccatga actgggtgaa gcagagccat     180
ggaaagagcc ttgagtggat tggacttatt actccttaca atggtgcttc tagctacaac     240
cagaagttca ggggcaaggc cacattaact gtagacaagt catccagcac agcctacatg     300
gacctcctca gtctgacatc tgaagactct gcagtctatt tctgtgcaag ggggggttac     360
gacgggaggg gttttgacta ctggggatcc gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc     420
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca     480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac     540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc     600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc     660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct     720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca     780
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc     840
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg     900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg     960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc    1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc    1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    1260
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag    1380
agcctctccc tgtctcccgg gaaatga                                        1407
```

<210> 2
<211> 468
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 2

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                   10                  15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
        35                  40                  45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn
65                  70                  75                  80

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

Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
    130                 135                 140

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                165                 170                 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
            180                 185                 190
```

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 3
<211> 700
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acactcggac 60
atcgagctca ctcagtctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg 120
acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggt accagcagaa gtcaggcacc 180
tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactggctt ctggagtccc aggtcgcttc 240
agtggcagtg ggtctggaaa ctcttactct ctcacaatca gcagcgtgga ggctgaagat 300
gatgcaactt attactgcca gcagtggagt aagcaccctc tcacgttcgg atccgggacc 360
aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat 420
gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 480
gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt 540
gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 600
aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 660
tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaat 700

<210> 4
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 4

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
35 40 45

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
50 55 60

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val
85 90 95

Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His
100 105 110

Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 5
<211> 1407
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 5

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120
tgcaaggcat ctggttactc attcactggc tacaccatga actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggacttatt actccttaca atggtgcttc tagctacaac 240
cagaagttca ggggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agggggttac 360
gacgggaggg gttttgacta ctggggatcc gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1407

<210> 6
<211> 468
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo Sintético

<400> 6

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

Gln Lys Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Ser Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 7
<211> 699
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 7

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagcgaa 60

attgtgttga cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaag agccaccctc 120

tcctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggt accaacagaa acctggccag 180

gctcccaggc tcctcatcta tgacacatcc aaactggctt ctggcgtccc agccaggttc 240

agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctcaccatca gcagcctaga gcctgaagat 300

tttgcagttt attactgtca gcagtggagt aagcaccctc tcacgttcgg atccgggacc 360

aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat 420

gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 480

gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt 540

gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 600

aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 660

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaa 699

<210> 8
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 8

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
35 40 45

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
50 55 60

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
85 90 95

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His
100 105 110

Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 9
<211> 1407
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 9

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120
tgcaaggcat ctggttactc attcactggc tacaccatga actgggtgaa gcaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat tggacttatt actccttaca atggtgcttc tagctacaac 240
cagaagttca ggggcaaggc caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt tctgtgcgag agggggttac 360
gacgggaggg gttttgacta ctggggatcc gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1407

<210> 10
<211> 468
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 10

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Ser Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 11
<211> 699
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 11

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagcgaa 60
attgtgttga cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaag agccaccatg 120
acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggt accaacagaa acctggccag 180
gctcccaggc tcctcatcta tgacacatcc aaactggctt ctggcgtccc agccaggttc 240
agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctcaccatca gcagcctaga gcctgaagat 300
tttgcagttt attactgtca gcagtggagt aagcaccctc tcacgttcgg atccgggacc 360
aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat 420
gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 480
gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt 540
gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 600
aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 660
tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaa 699

<210> 12
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 12

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                   10                  15

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
            20                  25                  30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
        35                  40                  45

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
    50                  55                  60

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
                85                  90                  95

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His
            100                 105                 110

Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
        115                 120                 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
    130                 135                 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145                 150                 155                 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
                165                 170                 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
        195                 200                 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
    210                 215                 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina y es capaz de provocar tanto citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos como citotoxicidad dependiente del complemento e internalizarse en las células positivas a la mesotelina, comprendiendo dicho anticuerpo una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, o una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo está conjugado a un agente quimioterapéutico.

3. Un anticuerpo según la reivindicación 2, en donde dicho agente quimioterapéutico comprende un radionúclido.

4. Un polinucleótido que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo según la reivindicación 1.

5. Un polinucleótido según la reivindicación 4, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 9.

6. Un polinucleótido según la reivindicación 4, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11.

7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende además un agente quimioterapéutico, una enzima, una proteína, un péptido, un aminoácido, un ácido nucleico, un lípido o un carbohidrato.

9. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4.

10. Una célula de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4.

11. Una célula de expresión que comprende un vector según la reivindicación 9.

12. Una célula de expresión según la reivindicación 11, en donde la célula es una célula de mamífero.

13. Una célula que produce un anticuerpo según la reivindicación 1.

14. Una célula según la reivindicación 13, en donde la célula es un hibridoma.

15. Un método para producir un anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina y es capaz de provocar tanto citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos como citotoxicidad dependiente del complemento e internalizarse en las células positivas a la mesotelina, comprendiendo el método las etapas de cultivar una célula según la reivindicación 14 y recuperar el anticuerpo del medio de crecimiento.

16. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en la inhibición en un sujeto del crecimiento de células displásicas positivas a la mesotelina.

17. Un anticuerpo para uso en terapia según la reivindicación 16, en donde las células displásicas son células de carcinoma de ovario, células de adenocarcinoma de páncreas, células de mesotelioma, células de carcinoma de pulmón o células de cáncer de próstata.

18. Un anticuerpo para uso en terapia según la reivindicación 16 o 17, en donde el sujeto es un ser humano.

19. Un anticuerpo para uso en terapia según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el anticuerpo no está conjugado o es una mezcla de un anticuerpo no conjugado y un anticuerpo conjugado a un agente quimioterapéutico.

20. El uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medicamento para uso en la inhibición en un sujeto del crecimiento de células displásicas positivas a la mesotelina.

21. El uso según la reivindicación 20, en donde el anticuerpo no está conjugado o es una mezcla de un anticuerpo no conjugado y un anticuerpo conjugado a un agente quimioterapéutico.

22. Un kit para uso en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto o para identificar la presencia de células displásicas positivas a la mesotelina *in vitro* o *in vivo*; en donde el kit comprende un anticuerpo según la reivindicación 1.

23. Un kit según la reivindicación 22, que comprende además al menos un reactivo quimioterapeútico o citotóxico o al menos un reactivo de diagnóstico.

24. Un kit según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, que comprende además medios e instrucciones para administrar el anticuerpo a un sujeto.

**FIGURA 1**

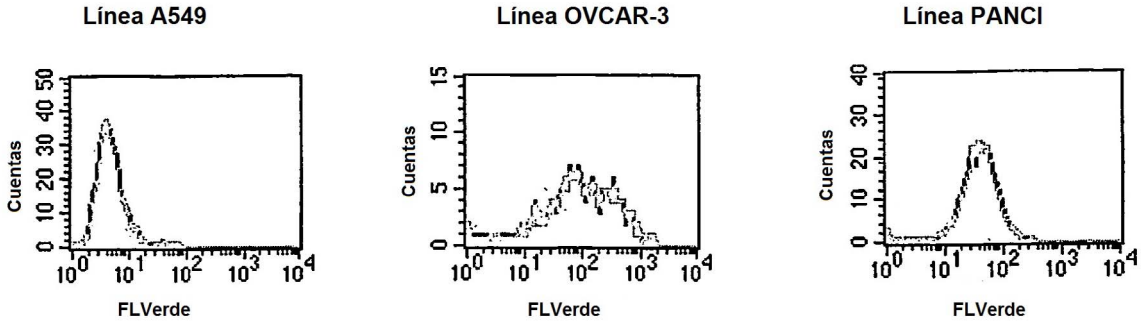


**FIGURA 2**

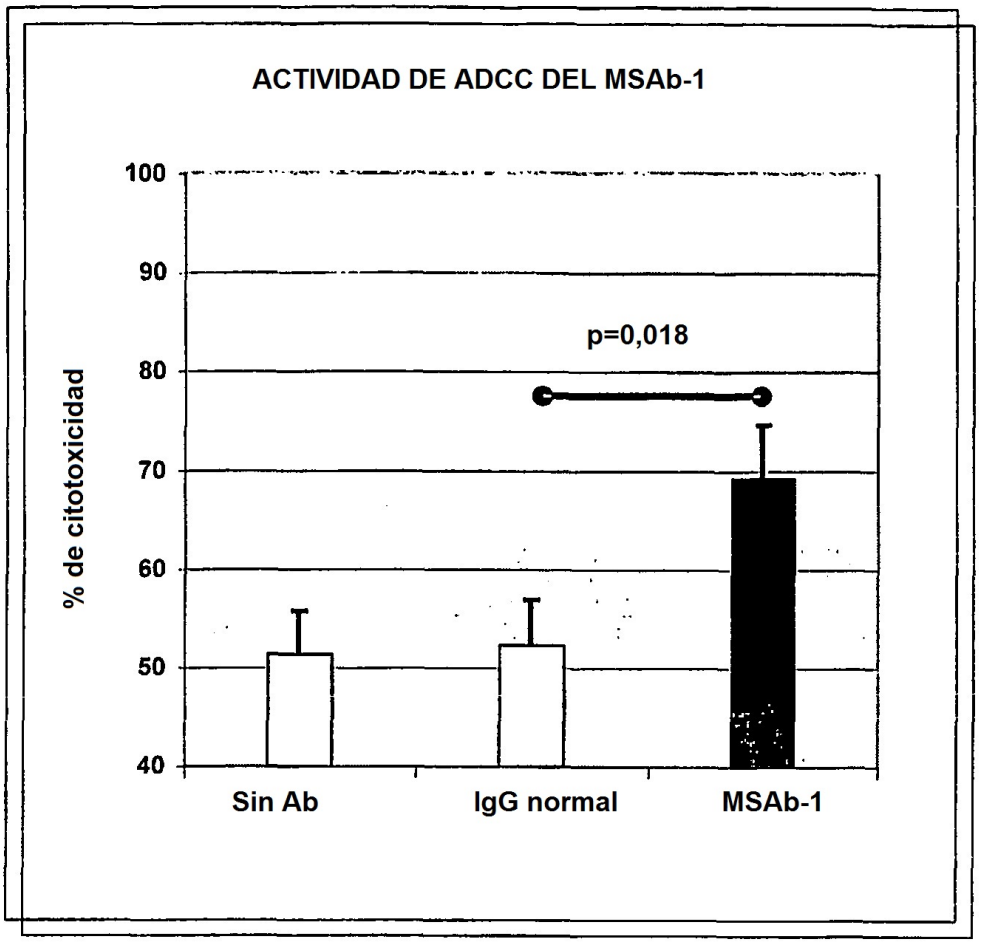
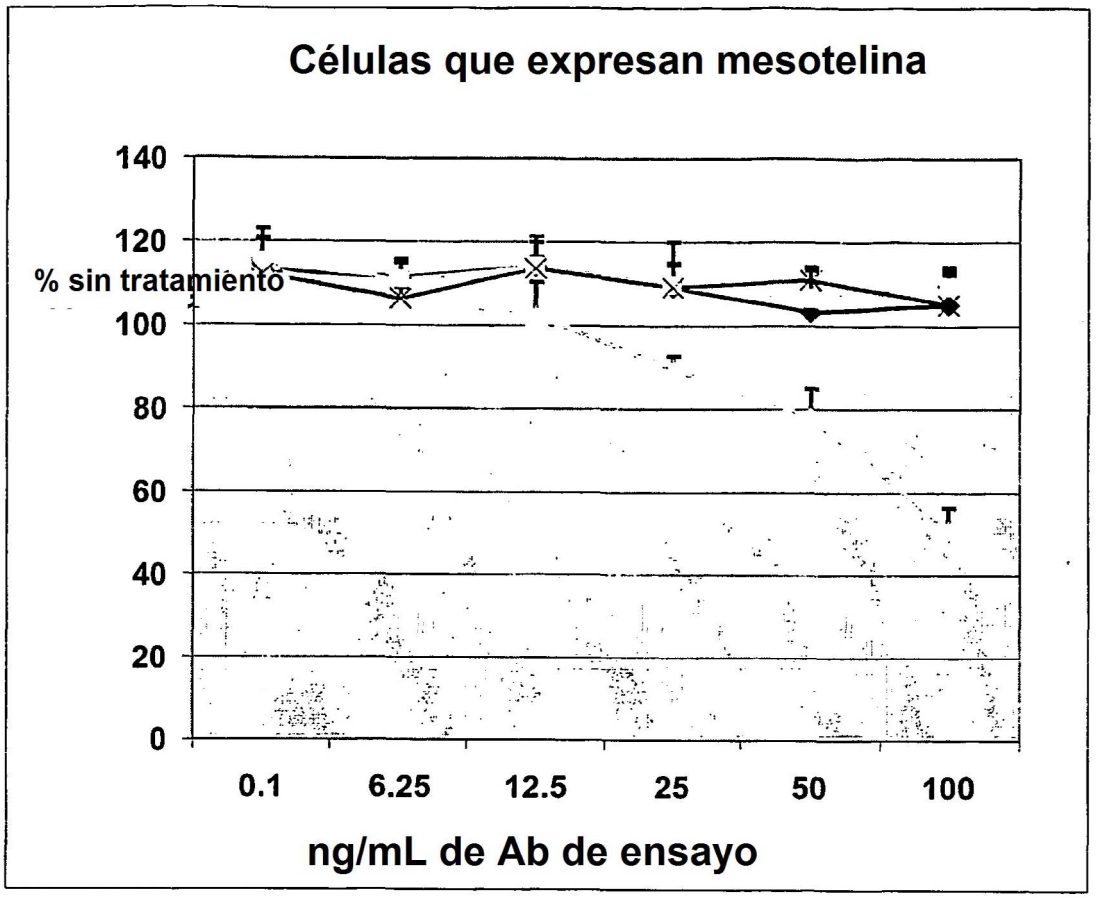

ACTIVIDAD DE ADCC DEL MSAb-1
% de citotoxicidad
100
90
80
70
60
50
40
p=0,018
Sin Ab
IgG normal
MSAb-1

**FIGURA 3**


Células que expresan mesotelina
140
120
% sin tratamiento
100
80
60
40
20
0
0.1
6.25
12.5
25
50
100
ng/mL de Ab de ensayo