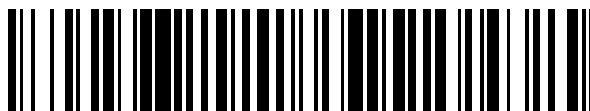


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 340**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2006 E 10180413 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2322560**

54 Título: **Anticuerpos anti-mesotelina**

30 Prioridad:

10.03.2005 US 660177 P

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

14.11.2013

73 Titular/es:

**MORPHOTEK, INC. (100.0%)
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

ES 2 429 340 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-mesotelina

Remisión a una solicitud afín

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. 60/660.177, presentada el 10 de marzo 2005.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a anticuerpos que se fijan específicamente a mesotelina. En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos son internalizados por células que expresan o son portadoras de mesotelina ("células mesotelina-positivas") o induce una actividad inmunoefectora sobre las células mesotelina-positivas. Los anticuerpos de la invención son útiles en el suministro específico de agentes farmacológicos a las células mesotelina-positivas así como en la suscitación de una actividad inmunoefectora sobre las células mesotelina-positivas, por ejemplo, células tumorales y sus precursoras. La exposición se refiere también a polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención, células que expresan los anticuerpos de la invención, métodos de producción de los anticuerpos de la invención, composiciones de los anticuerpos, métodos de inhibición del crecimiento de células displásicas que utilizan los anticuerpos, y métodos de tratamiento del cáncer que utilizan los anticuerpos.

15 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de páncreas es la quinta causa de mortalidad en los Estados Unidos, con una tasa de supervivencia de 5 años inferior al 5%. Aunque la radioterapia y la quimioterapia son los tratamientos recomendados y han alcanzado cierto éxito, ningún tratamiento actual consigue una supervivencia de 2 años para pacientes con enfermedad localmente avanzada y metastásica (Lawrence, *Semin. Oncol.*, 22: 68-71, 1995).

Una dificultad que se encuentra comúnmente cuando se tratan pacientes que padecen cáncer de páncreas y otros cánceres con fármacos citotóxicos de molécula pequeña es que la citotoxina causa toxicidad tanto a los tejidos normales como a los tejidos cancerosos. Un enfoque para obtener mayor especificidad para el tejido canceroso es el uso de anticuerpos que puedan direccionarse a antígenos específicos expresados en las células del cáncer que no son expresados o se expresan a un nivel inferior en las células normales. Estos antígenos diana pueden aprovecharse utilizando anticuerpos para destruir específicamente las células tumorales portadoras del antígeno por una diversidad de mecanismos que incluyen inhibición de la actividad biológica del antígeno, suscitación de una actividad inmunoefectora por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), o por suministrar inmuno- o radio-conjugados que, cuando se suministran a la célula portadora del antígeno, destruyen específicamente la célula diana. El descubrimiento de anticuerpos que puedan fijarse específicamente a las células tumorales portadoras del antígeno y destruir eficazmente las mismas ha sido difícil para muchos cánceres. Esto ha sido debido en parte a la imposibilidad de conseguir una lisis potente del tumor por causa de una falta de función inmunoefectora o de internalización eficiente de los anticuerpos portadores de inmunotoxinas. Debido al perfil de expresión para la mesotelina en el tejido patológico, existe una oportunidad de obtener un direccionamiento específico al tumor para diversos tipos de cáncer que incluyen, pero sin carácter limitante, los cánceres de páncreas, ovario y pulmón y el mesotelioma.

La mesotelina es una glicoproteína ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), sintetizada como un precursor de 69 kDa y procesada proteolíticamente en una forma de 30 kDa secretada en el terminal NH₂ y una forma de 40 kDa unida a la membrana (Yamaguchi, *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 805-808). La mesotelina se expresa fuertemente en la superficie de los cánceres de páncreas, cánceres de ovario, mesoteliomas, cánceres de pulmón, y algunos otros cánceres. Su expresión es limitada en los tejidos normales, lo que hace de ella una diana potencial para la terapia del cáncer. (Cao, *et al.*, *Mod. Pathol.* 14: 2005; Hassan, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2004 jun 15; 10 (12 Pt. 1): 3937-42).

La administración de anticuerpos contra la mesotelina ha sido propuesta como estrategia para el tratamiento del mesotelioma así como del cáncer de pulmón, ovario, y páncreas. Sin embargo, no se han desarrollado hasta ahora anticuerpos de longitud total contra la mesotelina que puedan suscitar una actividad inmunoefectora potente e internalizarse para suministro de conjugados tóxicos.

En 1992, Chang *et al.* describieron anticuerpos monoclonales que reconocían antígenos en las células del carcinoma de ovario humano (Chang, *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.* 1992 16:259-68). Este anticuerpo, denominado K1, estaba conjugado químicamente a una forma troncada de la exotoxina de *Pseudomonas* y se encontró que se fijaba a las células mesotelina-positivas y células del cáncer. Sin embargo, no era útil como conjugado de inmunotoxina debido a su pobre capacidad de internalización. La Patente U.S. No. 6.083.502 describe mesotelina y usos para direccionamiento a y diagnóstico de células mesotelina-positivas utilizando el anticuerpo K1.

Se han producido subsiguientemente anticuerpos monocatenarios que se fijan con afinidad alta y tienen afinidad antitumoral potente sobre los tumores mesotelina-positivos como conjugado. Un anticuerpo monocatenario de este tipo es SS1 (scFv)-PE38 que tiene una afinidad de fijación alta (K_d de 0,7 nM) para mesotelina. Este anticuerpo monocatenario es una forma estabilizada del Fv en la cual un puente disulfuro conecta los dominios de las cadenas ligera y pesada del Fv. Se ha demostrado que SS1 (scFv)-PE38 tiene actividad en la destrucción 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 han desarrollado también anticuerpos que pueden fijarse a mesotelina y han encontrado que la sobreexpresión de este antígeno está asociada con diversos cánceres (Scholler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 sep 28;96(20):11531-6; Ordóñez, *Am. J. Surg. Pathol.* 27:1418-28, 2003).

La Patente U.S. No. 6.809.184 describe un anticuerpo monocatenario de afinidad alta que se fija a mesotelina en un epítipo diferente que el anticuerpo K1. Se encontró que este fragmento de anticuerpo se internaliza en las células mesotelina-positivas como un fragmento monocatenario unido a una inmunotoxina. El anticuerpo se denominó SS1.

Los intentos para desarrollar anticuerpos inmunoconjugados que puedan direccionarse específicamente a mesotelina han alcanzado poco éxito debido a internalización y/o afinidad deficientes (Hassan, *et al.*, *J. Immunother.* 2000 julio-agosto; 23 (4): 473-9). Esta falta de internalización podría estar causada por afinidad baja o internalización deficiente debida a la composición del anticuerpo y/o la fijación del epítipo. Adicionalmente, se intentó la generación del anticuerpo monoclonal (mAb) K1 como inmunoconjugado dado que la forma no conjugada no era citotóxica en si misma (Hassan, *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 10: 3937-3942, 2004).

Se proporcionan en esta memoria anticuerpos in-out que pueden internalizarse en las células mesotelina-positivas y suscitar un efecto citotóxico por actividad inmunoefectora. Se proporcionan también terapias de anticuerpos para el cáncer, en particular para cánceres mesotelina-positivos, por ejemplo, cánceres de páncreas, ovario, mesotelioma, y pulmón, utilizando anticuerpos que suscitan una actividad inmunoefectora potente pero retienen la capacidad para internalizarse y facilitar el suministro de toxinas a las células mesotelina-positivas.

20 Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones, y cualquier información que no esté comprendida en las reivindicaciones se proporciona únicamente para información.

La invención proporciona anticuerpos específicos de mesotelina que suscitan alternativamente una función inmunoefectora potente o se internalizan en las células mesotelina-positivas, a los que se hace referencia en esta memoria como anticuerpos in-out de mesotelina. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpos in-out" ("in-out Abs") hace referencia a anticuerpos que pueden suscitar alternativamente una actividad inmunoefectora e internalizarse en una célula presentadora de antígeno por fijación al antígeno diana. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, se cree que los Abs in-out se fijan a la superficie celular de una célula antígeno-positiva y se internalizan después de cierto periodo de tiempo a no ser que sean atrapados por las células inmunoefectoras y/o productos bioquímicos que son reclutados por la célula antígeno-anticuerpo-positiva. Métodos para generación de anticuerpos que son capaces de suscitar un efecto inmunoefector de dicha citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y de internalizarse han sido descritos con anterioridad (Wolff, *et al.*, *Cancer Res.*, 1993, 1 de junio; 53: 2560-5); sin embargo, no es obvio que puedan desarrollarse anticuerpos in-out contra cualquier antígeno o epítipo (Kusano *et al.*, *Anticancer Res.*, 1993 nov-dic; 13(6A): 2207-12). Los anticuerpos que pueden direccionarse a antígenos de la superficie celular que se internalizan rutinariamente no siempre se internalizan después de fijación al antígeno de la superficie celular (Cogliati *et al.*, *Anticancer Res.* 11: 417-21, 1991). Además, los anticuerpos que pueden direccionarse a antígenos de la superficie celular no siempre suscitan una función inmunoefectora después de fijarse 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.* 22 de febrero; 5:3, 2005). Anticuerpos in-out que puedan direccionarse a mesotelina no se han descrito hasta ahora.

Se proporcionan en esta memoria anticuerpos que se fijan a la mesotelina del antígeno de superficie celular y pueden, como alternativa, suscitar una actividad inmunoefectora (*v.g.*, ADCC o CDC) y se internalizan en las células antígeno (mesotelina-)positivas. Estos anticuerpos son útiles para terapia del cáncer.

La invención proporciona anticuerpos que se fijan específicamente a la mesotelina, en donde los anticuerpos se distinguen de mAb (K1) en que (a) los anticuerpos se fijan con mayor afinidad y/o avidéz que mAb K1; (b) los anticuerpos suscitan un efecto inmunoefector tal como, pero sin carácter limitante, ADCC o CDC; y (c) como alternativa a (b), los anticuerpos se internalizan en las células mesotelina-positivas.

La invención proporciona anticuerpos que se fijan específicamente a la mesotelina en donde los anticuerpos se distinguen de SS1 en que (a) el anticuerpo se internaliza en las células mesotelina-positivas; y (b) como alternativa, los anticuerpos suscitan una actividad inmunoefectora, tal como, pero sin carácter limitante, ADCC o CDC. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se fijan con afinidad y/o avidéz diferentes que SS1.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos quiméricos, con inclusión pero sin carácter limitante, de anticuerpos quiméricos humano-ratón. Los anticuerpos de la invención pueden ser también anticuerpos humanizados. Los anticuerpos de la invención pueden ser también anticuerpos totalmente humanos. La invención proporciona también: células de 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 e la invención; y células de expresión que comprenden los vectores de la invención, a las que se hace referencia como transfectomas.

La invención proporciona también métodos de producción de los anticuerpos de la invención. En algunas realizaciones, los métodos implican un paso de cultivar un transfectoma o célula de hibridoma que expresa un anticuerpo de la invención. Las células productoras de anticuerpos de la invención pueden ser células bacterianas, de levadura, de insecto, o células animales, y preferiblemente son células de mamífero.

- 5 La invención proporciona adicionalmente métodos de detección de células mesotelina-positivas, tales como, pero sin carácter limitante, células tumorales o displásicas asociadas con la expresión incrementada de mesotelina con relación a las células normales, que comprenden administrar a tales células una composición que comprende un anticuerpo in-out de la invención. En realizaciones preferidas, los individuos son animales. En realizaciones más preferidas, los individuos son mamíferos. En una realización muy preferida, los individuos son humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos están conjugados a uno o más agentes quimioterapéuticos tales como, pero sin carácter limitante, radionucleidos, toxinas, y agentes citotóxicos y citostáticos. Los anticuerpos in-out pueden administrarse como un solo agente, como un anticuerpo conjugado o no conjugado, o en combinación con las formas conjugada o no conjugada de otro agente terapéutico.

- 15 Otras particularidades y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y los ejemplos que siguen.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra los resultados de un análisis FACS de la fijación de MSAb-1 a las células que expresan mesotelina (células de ovario OVCAR-3 y células de páncreas PANC1) en tanto que no se observa fijación alguna a las células A549. Estos datos se confirmaron por análisis de transferencia Western (no representado).

- 20 La **Figura 2** demuestra que MSAb-1 suscita una actividad potente de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La línea de células tumorales OVCAR-3 (considerada como diana) que expresa mesotelina se incubó con linfocitos de sangre periférica humana (PBLs) solos (sin pista Ab); con MSAb-1 y PBLs; o con Ig de control y PBLs (IgG normal). Los cultivos de células se ensayaron para destrucción por monitorización para liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH) que ocurre después de la lisis celular. Como se muestra aquí, MSAb-1 tiene actividad de ADCC sobre las células que expresan mesotelina.

- 25 La **Figura 3** demuestra que MSAb-1 se internaliza en las células que expresan mesotelina. La Figura 3 muestra la capacidad de MSAb-1 ligado a saporina (triángulos) para destruir las células en contraste con MSAb-1 no conjugado (X) mientras que un anticuerpo ML-1 de control isotipo no destruía las células en forma de toxina conjugada o no conjugada (rombos y cuadrados, respectivamente). Como control, se utilizaron células que no expresaban mesotelina. El MSAb-1 conjugado a la toxina no tiene efecto tóxico alguno sobre la forma conjugada o no conjugada en las células de control. Estos datos respaldan los descubrimientos de que MSAb-1 se internaliza en las células mesotelina-positivas.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

- 35 Los trabajos, patentes, solicitudes de patente, y literatura científica, con inclusión de los números de acceso a las secuencias de bases de datos de GenBank a que se hace referencia en esta memoria establecen el conocimiento de quienes poseen experiencia en la técnica. Cualquier conflicto entre cualquier referencia citada en esta memoria y las doctrinas específicas de esta memoria descriptiva deberá resolverse a favor de la última. Análogamente, cualquier conflicto entre una definición de un término o frase entendida en la técnica y una definición del término o frase como se expone específicamente en esta memoria descriptiva deberá resolverse a favor de la última.

- 40 Los trabajos estándar de referencia que exponen los principios generales de la tecnología del DNA recombinante conocida por los expertos en la técnica incluyen Ausubel *et al.* CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York (1998); Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva 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).

- 45 Debe entenderse que esta invención no está limitada a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares que pueden, por supuesto, variar. Debe entenderse también que la terminología utilizada en esta memoria tiene únicamente por finalidad describir realizaciones particulares, y no debe considerarse como limitante. Como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias plurales a no ser que el contenido indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, etcétera.

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

- 55 El término "aproximadamente", como se utiliza en esta memoria cuando se hace referencia a un valor susceptible de medida tal como una cantidad, una duración temporal, y magnitudes análogas, debe entenderse que abarca variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, aún más preferiblemente $\pm 1\%$, y todavía más

preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para realizar los métodos expuestos.

5 La invención proporciona métodos para reducir o inhibir el crecimiento de las células mesotelina-positivas (v.g., células de cáncer). Las células mesotelina-positivas que pueden ser inhibidas incluyen todas las células de cáncer que tienen una expresión incrementada de mesotelina en relación con los tejidos humanos normales, por ejemplo, pero sin carácter limitante, las células de cáncer de páncreas, cáncer de ovario, mesotelioma, y cáncer de pulmón.

10 Sin desear quedar ligados por ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que la expresión incrementada de mesotelina en las células de cáncer da como resultado una expresión incrementada en la superficie celular de la forma fijada a la membrana en la superficie de las células. Por tanto, las células de cáncer tienen una expresión incrementada de mesotelina con relación a los tejidos normales. Así pues, la mesotelina fijada a la membrana es una diana ideal para la terapia de anticuerpos in-out en el cáncer.

Como se utiliza en esta memoria, el término "epítotope" hace referencia a la porción de un antígeno a la cual se fija específicamente un anticuerpo monoclonal e incluye, por ejemplo, epítotope de conformación.

15 Como se utiliza en esta memoria, el término "epítotope de conformación" se refiere a un epítotope discontinuo formado por una relación espacial entre los aminoácidos de un antígeno distinta de una serie de aminoácidos continua o intacta.

Como se utiliza en esta memoria, el término "actividad inmunoefectora " se refiere a un anticuerpo que puede destruir las células por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

20 Como se utiliza en esta memoria, el término "anticuerpo in-out" se refiere a un anticuerpo que puede, como alternativa, suscitar una actividad inmunoefectora e internalizarse en la célula por fijación al antígeno diana.

25 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "como alternativa" cuando se hace referencia a la capacidad de un anticuerpo para internalizarse o suscitar una actividad inmunoefectora significa que el anticuerpo tiene la capacidad tanto para internalizarse como para suscitar una actividad inmunoefectora , pero no puede realizar ambas funciones simultáneamente.

30 Como se utiliza en esta memoria, el término "inhibición del crecimiento de células displásticas *in vitro*" significa una disminución en el número de células tumorales en cultivo de aproximadamente 5%, con preferencia aproximadamente 10%, de modo más preferible aproximadamente 20%, de modo más preferible aproximadamente 30%, de modo más preferible aproximadamente 40%, de modo más preferible aproximadamente 50%, de modo más preferible aproximadamente 60%, de modo más preferible aproximadamente 70%, de modo más preferible aproximadamente 80%, de modo más preferiblemente aproximadamente 90%, y de modo muy preferible aproximadamente 100%. La inhibición *in vitro* del crecimiento de las células tumorales puede medirse por ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo, el ensayo de agar blando de las células GEO. Como se utiliza en esta memoria, el término "inhibición del crecimiento de las células displásticas *in vivo*" significa una disminución en el número de células tumorales en un animal de aproximadamente 5%, con preferencia aproximadamente 10%, de modo más preferible aproximadamente 20%, de modo más preferible aproximadamente 30%, de modo más preferible aproximadamente 40%, de modo más preferible aproximadamente 50%, de modo más preferible aproximadamente 60%, de modo más preferible aproximadamente 70%, de modo más preferible aproximadamente 80%, de modo más preferible aproximadamente 90%, y de modo muy preferible aproximadamente 100%. La modulación *in vivo* del crecimiento de las células tumorales puede medirse por ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo, pero sin carácter limitante, la utilización de los parámetros de los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) (disponible en línea del Programa de Evaluación de la Terapia del Cáncer del Instituto Nacional del Cáncer).

45 Como se utiliza en esta memoria, "células displásticas" hace referencia a células que exhiben propiedades de crecimiento anormales, tales como, pero sin carácter limitante, crecimiento en agar blando, falta de inhibición de contacto, fracaso en el logro de la detención del ciclo celular en ausencia de suero, y formación de tumores cuando se inyectan en ratones inmunodeficientes. Las células displásticas incluyen, pero sin carácter limitante, tumores, hiperplasia, y análogos.

50 El término "prevención" hace referencia a la disminución de la probabilidad de que un organismo contraiga o desarrolle una condición anormal.

El término "tratamiento" hace referencia a la consecución de un efecto terapéutico y al menos al alivio parcial o la anulación de una condición anormal en el organismo. El tratamiento incluye inhibición del crecimiento del tumor, el mantenimiento de la inhibición del crecimiento de un tumor, e inducción de la remisión.

55 "Efecto terapéutico" hace referencia a la reducción, eliminación, o prevención de una enfermedad o condición anormal, síntomas de la misma, o efectos secundarios de la misma en el individuo. "Cantidad eficaz" hace referencia a una cantidad necesaria para producir un efecto deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la

- cantidad que, cuando se administra a un individuo para tratamiento de una enfermedad, condición o trastorno, es suficiente para conseguir el tratamiento de dicha enfermedad. Un efecto terapéutico alivia en cierto grado uno o más de los síntomas de la condición anormal. Con referencia al tratamiento de condiciones anormales, un efecto terapéutico puede hacer referencia a uno o más de los siguientes: (a) un aumento o disminución en la proliferación, crecimiento, y/o diferenciación de las células; (b) inhibición (es decir ralentización o parada) del crecimiento de las células tumorales in vivo, (c) promoción de la muerte celular; (d) inhibición de la degeneración; (e) alivio en cierto grado de uno o más de los síntomas asociados con la condición anormal; y (f) mejora de la función de una población de células. Los anticuerpos en esta memoria consiguen el efecto terapéutico solos o en combinación con conjugados de células o componentes adicionales de las composiciones de la invención.
- 5
- 10 Como se utiliza en esta memoria, el término "inhibe la progresión del cáncer" hace referencia a una actividad de un tratamiento que ralentiza la modulación de la enfermedad neoplásica hacia el cáncer de fase final en relación con la modulación hacia la enfermedad de fase final de las células del cáncer sin tratar.
- Como se utiliza en esta memoria, el término "enfermedad neoplásica" hace referencia a una condición marcada por proliferación anormal de células de un tejido.
- 15 Como se utiliza en esta memoria, el término "biomolécula" hace referencia a cualquier molécula que puede conjugarse a, o coadministrarse con, administrarse antes o después de la administración del anticuerpo, o utilizarse de cualquier otro modo en asociación con el anticuerpo de la invención. Las biomoléculas incluyen, pero sin carácter limitante, enzimas, proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, y fragmentos, homólogos, análogos, o derivados, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de biomoléculas incluyen, pero sin carácter limitante, interleuquina-2, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, rituxán, zevalín, herceptina, erbitux y avastina. Las biomoléculas pueden ser naturales, recombinantes, o sintéticas, y pueden modificarse con respecto a su forma nativa, por ejemplo con glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, miristilaciones, etcétera. El término biomolécula, como se utiliza en esta memoria, no está limitado a moléculas existentes naturalmente, e incluye moléculas sintéticas que no tienen origen biológico.
- 20
- 25 Como se utiliza en esta memoria, el término agente "citotóxico" o "citostático" hace referencia a un agente que reduce la viabilidad o el potencial proliferativo de una célula. Los agentes citotóxicos o citostáticos pueden funcionar de diversas maneras para reducir la viabilidad o proliferación celular, por ejemplo, pero no a modo de limitación, por inducción de deterioro del DNA, inducción de la parada del ciclo celular, inhibición de la síntesis de DNA, inhibición de la transcripción, inhibición de la traducción o síntesis de proteínas, inhibición de la división celular, o inducción de apoptosis. Como se utiliza en esta memoria, el término "agente quimioterapéutico" se refiere a agentes citotóxicos, citostáticos, y antineoplásicos que preferentemente destruyen, inhiben el crecimiento de, o inhiben la metástasis de las células neoplásicas o interrumpen el ciclo celular de las células que proliferan rápidamente. Ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin carácter limitante, radionucleidos, proteína antiviral de fitolaca, abrina, ricina y cada una de sus cadenas A, altretamina, actinomicina D, plicamicina, puromicina, gramicidina D, doxorubicina, colchicina, citocalasina B, ciclofosfamida, emetina, maitansina, ansacrina, cisplatino, etoposido, etoposido-ortoquinona, teniposido, daunorrubicina, gemcitabina, doxorubicina, mitoxantrona, bisantreno, bleomicina, metrotrexato, vindesina, adriamicina, vincristina, vinblastina, BCNU, taxol, tarceva, avastina, mitomicina, endotoxina A de *Pseudomonas* modificada, calicheamicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida y ciertas citoquinas tales como TNF-alfa y TNF-beta.
- 30
- 35
- 40 El término "variantes modificadas convencionalmente" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de ácido nucleico. Con respecto a secuencias particulares de ácido nucleico, variantes modificadas convencionalmente se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, hasta secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. Así pues, en cualquier posición en la que una alanina sea especificada por un codón, el codón puede alterarse por cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas convencionalmente. Cada secuencia de ácido nucleico citada en esta memoria que codifica un polipéptido describe también cualquier variación silenciosa posible del ácido nucleico. Una persona con experiencia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. De acuerdo con ello, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias sonda reales.
- 45
- 50
- 55
- "Recombinante", cuando se utiliza con referencia, v.g., a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector, ha sido modificado(a) por la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo(a) o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo(a), o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan por lo demás anormalmente, se infra-expresan o no se expresan en absoluto.
- 60

- La expresión "ácido nucleico" o "secuencia de polinucleótidos" se refiere a un polímero mono- o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leído desde el extremo 5' al extremo 3'. Los ácidos nucleicos pueden incluir también nucleótidos modificados que permiten la lectura correcta a su través por una polimerasa y no alteran la expresión de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico, con inclusión, por ejemplo, de variantes modificadas convencionalmente.
- "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan intercambiamente en esta memoria para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente existente naturalmente, así como a polímeros de aminoácidos existentes naturalmente y polímeros de aminoácidos no existentes naturalmente. Los polipéptidos de la invención, con inclusión de los anticuerpos de la invención, incluyen variantes modificadas convencionalmente. Una persona con experiencia reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia de proteína que alteren, añadan o delecionen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada convencionalmente", en donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas convencionalmente se suman a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención. Los ocho grupos que siguen contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras unos de otros: 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) Cisteína (C), Metionina (M) (33). El término "sustitución conservadora" incluye también el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental insustituido con tal que un polipéptido de este tipo exhiba también la actividad de fijación requerida.
- "Aminoácido" se refiere a aminoácidos existentes naturalmente y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos existentes naturalmente. Los aminoácidos existentes naturalmente son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que están modificados posteriormente, v.g. hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. "Análogo de aminoácido" hace referencia a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido existente naturalmente, *es decir*, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *v.g.*, homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido, y metionina-metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (*v.g.*, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido existente naturalmente. "Mimético de aminoácido" se refiere a un compuesto químico que tiene una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido existente naturalmente.
- Los aminoácidos pueden designarse en esta memoria por sus símbolos de tres letras conocidos comúnmente o por los símbolos de una sola letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB (véase Tabla 1 a continuación). Asimismo, los nucleótidos pueden designarse por sus códigos de una sola letra aceptados comúnmente.

TABLA 1

SÍMBOLO		
De 1 letra	De 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

SÍMBOLO

De 1 letra	De 3 letras	AMINOÁCIDO
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	Ácido L-glutámico
W	Trp	L-triptófano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	L-ácido aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

Debe indicarse que todas las secuencias de aminoácidos se representan en esta memoria por fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha se presenta en la dirección convencional del término amino al término carboxi.

5 Como se utiliza en esta memoria, el término "in vitro" o "ex vivo" se refiere a un ambiente artificial y a procesos o reacciones que ocurren dentro de un entorno artificial, por ejemplo, pero sin carácter limitante, tubos de ensayo y cultivos de células. El término "*in vivo*" se refiere a un entorno natural (v.g., un animal o una célula) y a procesos o reacciones que ocurren dentro de un entorno natural.

10 "Farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramáticas de los mismos, cuando se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se utilizan intercambiamente y representan que los materiales son susceptibles de administración a o en un humano sin la producción de efectos fisiológicos indeseables en un grado que pudiera prohibir la administración de la composición.

15 El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a reactivos, excipientes, células, compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un criterio médico sano, adecuados para uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y los animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otra complicación excesiva compatible con una ratio beneficio/riesgo razonable. Como se describe con mayor detalle en esta memoria, los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para uso en la presente invención incluyen gases, líquidos, y materiales semisólidos y sólidos.

20 Excepto cuando se indica, "individuo" o "paciente" se utilizan intercambiamente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales experimentales tales como conejos, perros, gatos, ratas, ratones, y otros animales. De acuerdo con ello, "individuo" o "paciente" como se utiliza en esta memoria significa cualquier paciente o individuo mamífero al cual pueden administrarse las composiciones de la invención. En algunas realizaciones de la presente invención, el paciente padecerá una enfermedad infecciosa o inflamatoria. En algunas realizaciones de la presente invención, el paciente habrá sido diagnosticado de cáncer. En una realización ilustrativa de la presente invención, a fin de identificar pacientes candidato para tratamiento de acuerdo con la invención, se emplean métodos de cribado aceptados para determinar el estatus de una enfermedad o afección existente en un individuo o factores de riesgo asociados con una enfermedad o afección diagnosticada o sospechada. Estos métodos de cribado incluyen, por ejemplo, exámenes para determinar si un individuo padece una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria, o cáncer. Estos y otros métodos de rutina permiten al clínico seleccionar individuos que se hallan en necesidad de terapia.

30 "Compuesto terapéutico", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a un compuesto útil en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o afección tal como cáncer.

35 "Administración concomitante", "administración concurrente", o "co-administración", como se utiliza en esta memoria, incluye administración de los agentes activos (v.g., mAbs, agentes quimioterapéuticos, biomoléculas), en asociación o combinación, juntos, o antes o después uno de otro. El o los agentes múltiples pueden administrarse por la misma o diferentes rutas, simultánea o secuencialmente, con tal que los mismos se administren de una manera suficiente para permitir que todos los agentes alcancen concentraciones eficaces en el sitio de acción. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica no tendrá dificultad alguna en determinar la temporización, secuencia, y dosis de administración apropiadas para fármacos y composiciones particulares de la presente invención.

40 "Inmunoglobulina" o "anticuerpo" se utiliza ampliamente para hacer referencia tanto a moléculas de anticuerpo como a una diversidad de moléculas derivadas de anticuerpos e incluye cualquier miembro de un grupo de glicoproteínas que existen en los mamíferos superiores que son componentes principales del sistema inmunitario. El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpo (v.g., Fab, F(ab')₂, y Fv), con tal que los mismos exhiban la actividad biológica

deseada. Una molécula de inmunoglobulina incluye dominios de fijación de antígeno, que incluyen cada uno las cadenas ligeras y la porción terminal extrema de la cadena pesada, y la región Fc, que es necesaria para una diversidad de funciones, tales como la fijación del complemento. Existen 5 clases de inmunoglobulinas en donde 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 e IgM, respectivamente. Como se utiliza en esta memoria, "inmunoglobulina" o "anticuerpo" incluye todas las subclases de alfa, delta, épsilon, gamma, y mu y se refiere también a cualesquiera multímeros naturales (v.g., IgA e IgM) o sintéticos de la estructura de cuatro cadenas de la inmunoglobulina. Los anticuerpos se fijan de modo no covalente, específicamente, y reversiblemente a un antígeno. El término "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, que los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posibles que se producen naturalmente, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos por un solo clon de células productoras de anticuerpo. Al contrario que los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales son monoespecíficos (v.g., específicos para un solo epítipo de un solo antígeno). El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo expresando que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden producirse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495, 1975, o pueden producirse por métodos de DNA recombinante. Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también a partir de bibliotecas de anticuerpos de fago utilizando las técnicas descritas en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597, 1991, por ejemplo.

Las moléculas derivadas de anticuerpos comprenden porciones de anticuerpos intactos que retienen especificidad de fijación de antígeno, y comprenden, por ejemplo, al menos una región variable (una región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera). 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 cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros constituidos por una cadena pesada y una cadena ligera, etcétera. Se incluyen todas las clases de inmunoglobulinas (v.g., IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) y subclases de las mismas.

Los anticuerpos pueden estar marcados/conjugados a restos tóxicos o no tóxicos. Restos tóxicos incluyen, por ejemplo, toxinas bacterianas, toxinas virales, radioisótopos, y análogos. Los anticuerpos pueden estar marcados para uso en ensayos biológicos (v.g., marcadores de radioisótopos, marcadores fluorescentes) para ayudar a la detección del anticuerpo. Los anticuerpos pueden estar también marcados/conjugados para propósitos diagnósticos o terapéuticos, v.g., con isótopos radiactivos que suministran radiación directamente a un sitio deseado para aplicaciones tales como radioinmunoterapia (Garmestani *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 28:409, 2001), técnicas de producción de imágenes y cirugía radioinmunoguiada o marcadores que hacen posible la obtención de imágenes *in vivo* o la detección de complejos específicos anticuerpo/antígeno. Los anticuerpos pueden conjugarse también con toxinas para proporcionar una inmunotoxina (véase, Kreitman, R.J. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 31:53, 1998).

Con respecto a los anticuerpos, el término "inmunológicamente específico" se refiere a anticuerpos que se fijan a uno o más epítopes de una proteína de interés, pero que no reconocen sustancialmente y se fijan a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas biológicas antigénicas.

Los anticuerpos "quiméricos" o "quimerizados" (inmunoglobulinas) hacen referencia a anticuerpos en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico a o homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, con tal que los mismos exhiban la actividad biológica deseada (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 6851-6855, 1984).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (v.g., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de anticuerpos de fijación de antígeno) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos Fv de región de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados por residuos correspondientes no humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias de entramado. Estas modificaciones se hacen para refinar ulteriormente y optimizar la eficiencia del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad

de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá óptimamente también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525, 1986; Reichman *et al.*, *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596, 1992.

- 5 "Totalmente humano" hace referencia a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, en donde la molécula entera es de origen humano o está constituida por una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo.

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

- 10 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria pueden utilizarse en la práctica para el testado de la presente invención, se describen en esta memoria los materiales y métodos preferidos. En la descripción y las reivindicaciones de la presente invención, se utilizará la terminología siguiente.
- 15

Anticuerpos

- Los anticuerpos in-out de la invención se fijan específicamente a mesotelina y exhiben, como alternativa, la capacidad para inducir una actividad inmunoefectora y la capacidad para internalizarse en células mesotelina-positivas. En algunas realizaciones, los anticuerpos se fijan al mismo epítotope que mAb K1 o SS1. En otras realizaciones, los anticuerpos se fijan a un epítotope distinto del fijado por mAb K1 o SS1.
- 20

- Los anticuerpos adecuados para uso en el método de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos totalmente humanos, homólogos de anticuerpos humanos, homólogos de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, homólogos de anticuerpos quiméricos, y monómeros o dímeros de cadenas pesada o ligera de anticuerpo o mixturas de los mismos. Los anticuerpos de la invención pueden incluir inmunoglobulinas intactas de cualquier isotipo con inclusión de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de los mismos). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina puede ser kappa o lambda.
- 25

- Los anticuerpos in-out de la invención incluyen porciones de anticuerpos intactos que retienen especificidad de fijación de antígeno, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(v), monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros constituidos por una cadena pesada y una ligera, y análogos. Así, los fragmentos de fijación de antígeno, así como polipéptidos dímeros o trímeros de longitud total derivados de los anticuerpos arriba descritos son en sí mismos útiles para exhibir actividad in-out.
- 30

- Los anticuerpos quiméricos pueden producirse por tecnología de DNA recombinante en la cual la totalidad o parte de la región bisagra y las regiones constantes de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, o ambas, se han empleado en sustitución de las regiones correspondientes de otra cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina de otro animal. De esta manera, la porción de fijación de antígeno del anticuerpo monoclonal parental está injertada en la cadena principal de un anticuerpo de otra especie. Un enfoque, descrito en EP 0239400 otorgada a Winter *et al.* describe el empleo de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de una especie en sustitución de las de otra especie, tales como la sustitución de las CDRs de dominios de región variable de inmunoglobulina humana de cadena pesada y ligera con CDRs de dominios de región variable de ratón. Estos anticuerpos alterados pueden combinarse subsiguientemente con regiones constantes de inmunoglobulina humana para formar anticuerpos que son humanos excepto en lo que respecta a las CDRs murinas sustituidas que son específicas del antígeno. Métodos para injertar regiones CDR de anticuerpos pueden encontrarse, por ejemplo, en Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-327 y Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239: 1534-1536.
- 35
- 40

- 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 se requiere para fijación de antígeno se ha empleado en sustitución del aminoácido correspondiente de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina de mamífero no humano. Por ejemplo, si la inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal de ratón, al menos un aminoácido que no se requiere para fijación de antígeno se sustituye utilizando el aminoácido que está presente en un anticuerpo humano correspondiente en dicha posición. Sin desear quedar ligados por ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que la "humanización" del anticuerpo monoclonal inhibe la reactividad inmunológica humana contra la molécula de inmunoglobulina extraña.
- 45
- 50

- Como un ejemplos no limitante, un método de realización de injerto de una región determinante de la complementariedad (CDR) puede realizarse por secuenciación de las cadenas pesada y ligera de ratón del anticuerpo de interés que se fija al antígeno diana (v.g., mesotelina) y modificación por ingeniería genética de las secuencias de DNA CDR e imponiendo estas secuencias de aminoácidos a regiones V humanas correspondientes por mutagénesis orientada. Se añaden segmentos génicos de región constante humana del isotipo deseado, y los genes de las cadenas pesada y ligera "humanizados" se co-expresan en células de mamífero para producir un
- 55

anticuerpo humanizado soluble. Una célula de expresión típica es una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO). Métodos adecuados para creación de los anticuerpos quiméricos pueden encontrarse, por ejemplo, en Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann (1988), *Nature* 332:323-327; Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029; y Orlandi *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833.

- 5 Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 y WO 90/07861 describen la preparación de un anticuerpo humanizado. Las regiones de entramado variables humana y de ratón se seleccionaron para homología óptima de la secuencia de proteínas. La estructura terciaria de la región variable murina se modelizó por computadora y se superpuso sobre el entramado humano homólogo para mostrar la interacción óptima de los residuos de aminoácidos con las CDRs de ratón. Esto condujo al desarrollo de anticuerpos con afinidad de fijación
10 mejorada para el antígeno (que se reduce típicamente después de producir los anticuerpos quiméricos injertados en CDR). Enfoques alternativos a la producción de anticuerpos humanizados se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Tempest (1991) *Biotechnology* 9: 266-271.

- La expresión "anticuerpos monocatenarios" hace referencia a anticuerpos formados por técnicas de DNA recombinante en las cuales los fragmentos de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina están enlazados a la
15 región Fv por un tramo de aminoácidos modificado por ingeniería genética. Se conocen diversos métodos de generación de anticuerpos monocatenarios, con inclusión de los descritos en la Patente U.S. U.S. Patent 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 invención incluyen derivados que están modificados, *v.g.*, por la unión covalente de cualquier
20 tipo de molécula al anticuerpo de tal modo que la fijación covalente no impide que el anticuerpo se fije a su epítope. Ejemplos de derivados adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, 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 de la invención y derivados de los mismos pueden estar derivatizados en sí mismos por grupos protectores/bloqueadores conocidos,
25 escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otras proteínas, y métodos análogos. 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 invención incluyen variantes que tienen sustituciones, deleciones, adiciones, o
30 reemplazamientos simples o múltiples de aminoácidos que retienen las propiedades biológicas (*v.g.*, internalización, afinidad o avidéz de fijación, o actividad inmunofectora) de los anticuerpos de la invención. La persona experta puede producir variantes que tienen sustituciones, deleciones, adicionales o reemplazamientos simples o múltiples de aminoácidos. Estas variantes pueden incluir, *inter alia*: (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
35 o más aminoácidos se han añadido al o se han delecionado del 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 tal como una pareja de fusión, un marcador de proteína u otro resto químico, que puede conferir propiedades útiles al polipéptido, tal como, por ejemplo, un epítope para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, un resto biotina y análogos. Los anticuerpos de la invención pueden incluir variantes en las cuales se
40 emplean residuos de aminoácidos de una especie en sustitución del residuo correspondiente en otra especie, en las posiciones conservadas o no conservadas. En otra realización, residuos de aminoácidos en posiciones no conservadas están sustituidos con residuos conservadores o no conservadores. Los métodos de obtención de estas variantes, con inclusión de técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas, y enzimáticas, son conocidas por las personas que poseen experiencia ordinaria en la técnica. Los anticuerpos de la invención
45 incluyen también fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento" se refiere a secuencias de polipéptidos que tienen con preferencia al menos aproximadamente 40, de modo más preferible al menos aproximadamente 50, de modo más preferible al menos aproximadamente 60, de modo más preferible al menos aproximadamente 70, de modo más preferible al menos aproximadamente 80, de modo más preferible al menos aproximadamente 90, y de modo más preferible al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, y que retienen cierta actividad biológica o
50 actividad inmunológica de la secuencia de longitud total, por ejemplo, afinidad o avidéz de fijación de mesotelina, la capacidad para internalizarse, y actividad inmunofectora.

- La invención abarca también anticuerpos totalmente humanos tales como los derivados de células mononucleares de sangre periférica de pacientes que tienen células de cáncer mesotelina-positivas, por ejemplo, pacientes cáncer
de ovario, cáncer de pulmón, mesotelioma, o de cáncer de páncreas. Tales células pueden estar fusionadas con
55 células de mieloma, por ejemplo, para formar células de hibridoma que producen anticuerpos totalmente humanos contra mesotelina.

En algunas realizaciones preferidas, la cadena pesada del anticuerpo está codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende 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
AGCCAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAAC
TGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCT
TACAATGGTGCCTTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACATTAAC
GTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAA
GACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGAC
TACTGGGGATCCGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA
CCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC

ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA
TGA

ES 2 429 340 T3

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

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
AGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAAC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACTTATTACTCCT
TACAATGGTGTCTTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAGAGTCACCATGACC
AGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG
GACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGAC
TACTGGGGATCCGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCA
CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTC
AGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAA
TGA

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

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
AGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAAC
TGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATTGEACTTATTACTCCT
TACAATGGTGTCTTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAGGCCACCATGACC
AGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG
GACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGAC
TACTGGGGATCCGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCA
CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGAC

**ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAG
 CTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
 GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACC
 ACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA
 TGA.**

En algunas realizaciones preferidas, la cadena ligera del anticuerpo está codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende 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

**ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
 TCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAG
 AAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGAAGTTACATGCACTGGTAC
 CAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTG**

5

**GCTTCTGGAGTCCAGTTCGCTTCACTGTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAACTCTTACTCT
 CTCACAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAG
 TGGAGTAAGCACCCCTCTCAGTTCCGATCCGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA
 ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
 TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
 AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
 GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
 CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAAT**

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

**ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
 AGCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA
 AGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGAAGTTACATGCACTGGTAC
 CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGACACATCCAACTG
 GCTTCTGGCGTCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
 CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAG
 TGGAGTAAGCACCCCTCTCAGTTCCGATCCGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA
 ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
 TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
 AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
 GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
 CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAAT**

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

**ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACAC
AGCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA
AGAGCCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTAC
CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGACACATCCAACTG
GCTTCTGGCGTCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG
TGGAGTAAGCACCCCTCTCACGTTCCGGATCCGGGACCAAGGTGGAATCAAACGA
ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA.**

Los anticuerpos y derivados de los mismos de la invención tienen afinidades de fijación que incluyen una constante de disociación (K_d) menor que 1×10^{-2} . En algunas realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-3} . En otras realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-4} . En algunas realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-5} . En otras realizaciones adicionales, la constante K_d es menor que 1×10^{-6} . En otras realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-7} . En otras realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-8} . En otras realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-9} . En otras realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-10} . En otras realizaciones adicionales, la constante K_d es menor que 1×10^{-11} . En otras realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-12} . En otras realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-13} . En otras realizaciones, la constante K_d es menor que 1×10^{-14} . En otras realizaciones adicionales, la constante K_d es menor que 1×10^{-15} .

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o con (v.g., coadministrarse o conjugarse a) una biomolécula o agente quimioterapéutico tal como un agente citotóxico o citostático. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un radionucleido, que incluye, pero sin carácter limitante, plomo-212, bismuto-212, astato-211, yodo-131, escandio-47, renio-186, renio-188, itrio-90, yodo-123, yodo-125, bromo-77, indio-111, y nucleidos fisionables tales como boro-10 o un actínido. En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es una toxina o un fármaco citotóxico, con inclusión pero sin carácter limitante de ricina, enterotoxina A de *Pseudomonas* modificada, calicheamicina, adriamicina, 5-fluorouracilo, y análogos. Métodos de conjugación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo a tales agentes se conocen en la bibliografía.

Sin desear quedar ligados por teoría particular alguna de funcionamiento, se cree que los anticuerpos in-out de la invención son particularmente útiles para fijarse a mesotelina debido a una avidéz incrementada del anticuerpo dado que ambas "ramas" de anticuerpo (fragmentos Fab) se fijan a moléculas de mesotelina separadas. Esto conduce a una disminución en la disociación (K_d) del anticuerpo y a un aumento global en la afinidad observada (K_D). Adicionalmente, los anticuerpos de esta invención se fijan a epítopes que permiten la internalización del complejo anticuerpo-antígeno. Estas son particularidades especialmente satisfactorias para direccionamiento de tumores, dado que los anticuerpos de la invención se fijarán preferentemente al tejido tumoral con respecto al tejido normal para atraer células inmunes y biomoléculas para citotoxicidad y son susceptibles de internalización para suministro de agentes conjugados para efecto terapéutico.

Ácidos nucleicos

La invención incluye también ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y/o la cadena ligera de los anticuerpos anti-mesotelina de la invención. "Ácido nucleico" o una "molécula de ácido nucleico" como se utiliza en esta memoria, hace referencia a cualquier molécula de DNA o RNA, sea mono- o bicatenaria y, en caso de ser monocatenaria, la molécula de su secuencia complementaria en forma lineal o circular. En la discusión de las moléculas de ácido nucleico, una secuencia o estructura de una molécula de ácido nucleico particular puede describirse en esta 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, hace referencia a una molécula de ácido nucleico que está separada de las secuencias con las cuales la misma está inmediatamente en contigüidad en el genoma existente naturalmente 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 vector de plásmido o virus, o integrada en el DNA genómico de una célula u organismo hospedador procarionta o eucarionta. Cuando se aplica a RNA, el término "ácido nucleico aislado" se refiere fundamentalmente a una molécula de RNA codificada por una molécula de DNA aislada como se define arriba. Alternativamente, el término puede hacer referencia a una molécula de RNA que se ha separado suficientemente de otros ácidos nucleicos con los cuales estaría asociada la misma en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un ácido nucleico aislado (sea DNA o RNA) puede representar adicionalmente una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos y separada de otros componentes presentes durante su producción.

Los ácidos nucleicos de la invención incluyen ácidos nucleicos que tienen al menos 80%, de modo más preferible al menos aproximadamente 90%, de modo más preferible al menos aproximadamente 95%, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 98% de homología con los ácidos nucleicos de la invención. Los términos "porcentaje de semejanza", "porcentaje de identidad" y "porcentaje de homología", cuando se refieren a una secuencia particular se utilizan como se indica en el programa de software 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 incorrectos) una vez alineados. En otros casos, puede haber hasta aproximadamente un desapareamiento de 20% en las secuencias.

Los ácidos nucleicos de la invención incluyen también fragmentos de los ácidos nucleicos de la invención. Un "fragmento" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que tiene con preferencia al menos aproximadamente 10 ácidos nucleicos de longitud, de modo más preferible aproximadamente 40 ácidos nucleicos, y de modo muy preferible aproximadamente 100 ácidos nucleicos de longitud. 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 codificante completa de un gen y puede incluir regiones 5' y 3' no traducidas.

En algunas realizaciones de la invención, la cadena pesada del anticuerpo está codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 5, ó 9. En algunas realizaciones de la invención, la cadena ligera del anticuerpo anti-mesotelina está codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, 7, ó 11. En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican a la vez una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo de la invención.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden estar 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 estar insertada(o) otra secuencia o elemento genético (sea DNA o RNA) a fin de conseguir la replicación de la secuencia o elemento fijada(o). Un "replicón" es cualquier elemento genético, por ejemplo, un plásmido, cósmido, bácmido, fago, cromosoma artificial (BAC, YAC) o virus, que es capaz de replicación en gran parte bajo su propio control. Un replicón puede ser RNA o DNA y puede ser mono- o bicatenario. En algunas realizaciones, el vector de expresión contiene un segmento promotor constitutivamente activo (tal como, pero sin carácter limitante, CMV, SV40, Factor de Elongación o secuencias LTR) o una secuencia promotora inducible tal como el vector pIND inducible por esteroides (Invitrogen), donde la expresión del ácido nucleico puede estar regulada. Los vectores de expresión de la invención pueden comprender adicionalmente secuencias reguladoras, por ejemplo, un sitio de entrada de ribosoma interno. El vector de expresión puede introducirse en una célula por transfección, por ejemplo.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención pueden expresarse recombinantemente. Las células de expresión de la invención incluyen cualesquiera líneas de células de expresión de insecto conocidas, tales como por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda*. Las líneas de células de expresión pueden ser también líneas de células de levadura, tales como, por ejemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de expresión pueden ser también células de mamífero tales como, por ejemplo, células de Ovario de Hámster Chino, células de riñón de cría de hámster, la línea de riñón embrionario humano 293, líneas de células de riñón normal de perro, líneas de células de riñón normal de gato, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano, células COS, y células G8 de mioblastos de ratón no-tumorigeno, líneas de células fibroblastos, líneas de células de mieloma, células NIH/3T3 de ratón, células LMTK, células Sertoli de ratón, células de carcinoma cervical humano, células de hígado de rata-búfalo, células de pulmón humano, células de hígado humano, células de tumor mamario de ratón, células TRI, células MRC5, y células FS4. Los ácidos nucleicos de la invención pueden introducirse en una célula por transfección, por ejemplo. Los anticuerpos expresados recombinantemente pueden recuperarse del medio de crecimiento de las células, por ejemplo.

Métodos de producción de los anticuerpos in-out para mesotelina

Inmunización de los animales

La invención proporciona también métodos de producción de anticuerpos monoclonales in-out que se fijan específicamente a mesotelina. Los anticuerpos de la invención pueden producirse *in vivo* o *in vitro*. Una estrategia para generación de anticuerpos contra mesotelina implica la inmunización de los animales con mesotelina o células que expresan mesotelina. Los animales así inmunizados producirán anticuerpos contra la proteína. Se conocen métodos estándar para la creación de anticuerpos monoclonales que incluyen, pero sin carácter limitante, la técnica del hibridoma (véase Kohler & Milstein, (1975) *Nature* 256: 495-497); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72) y la técnica del hibridoma 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 antígeno-positiva se combina generalmente con un adyuvante para promover inmunogenicidad. Los adyuvantes varían de acuerdo con la especie utilizada para inmunización. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero sin carácter limitante: adyuvante completo de Freund ("FCA"), adyuvante incompleto de Freund ("FIA"), geles minerales (v.g., hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas (v.g.,

lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones), péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa bocallave ("KLH"), dinitrofenol ("DNP") y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como el Bacilo Calmette-Guerin ("BCG"), y *Corynebacterium parvum*. Tales adyuvantes son también bien conocidos en la técnica.

5 La inmunización puede realizarse utilizando procedimientos bien conocidos. La dosis y el régimen de inmunización dependerán de la especie de mamífero inmunizada, su estatus de inmunidad, el peso corporal, y/o área de superficie calculada, etc. Típicamente, se toman muestras de suero sanguíneo de los mamíferos inmunizados y se ensayan respecto a anticuerpos anti-mesotelina utilizando ensayos de cribado apropiados como los descritos más adelante, por ejemplo.

10 La mesotelina puede purificarse a partir de células o de sistemas recombinantes utilizando una diversidad de técnicas bien conocidas para aislamiento y purificación de proteínas. Por ejemplo, pero sin carácter de limitación, la mesotelina puede aislarse basándose en el peso molecular aparente de la proteína pasando la proteína por un gel SDS-PAGE y transfiriendo las proteínas a una membrana. Después de ello, la banda de tamaño apropiado correspondiente a la mesotelina puede cortarse de la membrana y utilizarse directamente como inmunógeno en los animales, o extrayendo o eluyendo primeramente la proteína de la membrana. Como un ejemplo alternativo, la proteína puede aislarse por cromatografía de exclusión de tamaños sólo o en combinación con otros medios de aislamiento y purificación. Otros medios de purificación están disponibles en textos de referencia estándar tales como Zola, MONOCLONAL ANTIBODIES: PREPARATION AND USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND ENGINEERED ANTIBODY DERIVATIVES (BASICS: FROM BACKGROUND TO BENCH) Springer-Verlag Ltd., Nueva York, 2000; BASIC METHODS IN ANTIBODY PRODUCTION AND CHARACTERIZATION, Capítulo 11, "Antibody Purification Methods," Howard and Bethell, Eds., CRC Press, 2000; ANTIBODY ENGINEERING (SPRINGER LAB MANUAL.), Kontermann and Dubel, Eds., Springer-Verlag, 2001.

Otra estrategia para generación de anticuerpos in-out contra mesotelina implica la inmunización de animales con péptidos correspondientes a regiones de la forma de mesotelina unida a la membrana que permiten la internalización de anticuerpos que retienen una actividad inmunofectora potente.

25 Los animales así inmunizados producirán anticuerpos contra la proteína. Se conocen métodos estándar para creación de anticuerpos monoclonales que incluyen, pero sin carácter limitante, la técnica del hibridoma (véase Kohler y Milstein, (1975) *Nature* 256:495-497); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de las células B humanas (véase Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72) y la técnica del hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, *et al.* en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96).

35 Los esplenocitos de animales inmunizados pueden immortalizarse por fusión de esplenocitos (que contienen las células B productoras de anticuerpos) con una línea de células inmortales tal como una línea de mieloma. Típicamente, la línea de células de mieloma procede de la misma especie que el donante de los esplenocitos. En una realización, la línea de células inmortales es sensible a un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). En algunas realizaciones, las células de mieloma son negativas para la infección del virus Epstein-Barr (EBV). En realizaciones preferidas, las células de mieloma son HAT-sensibles, EBV-negativas y negativas a la expresión de Ig. Puede utilizarse cualquier mieloma adecuado. Pueden generarse hibridomas murinos utilizando líneas de células de mieloma de ratón (v.g., las líneas de mieloma T3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14). Estas líneas de mieloma murino están disponibles de la ADCC. Estas células de mieloma se fusionan a los esplenocitos donantes en polietilén-glicol ("PEG"), preferiblemente polietilenglicol de peso molecular 1500 ("PEG1500"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan en medio HAT que destruye las células de mieloma no fusionadas y fusionadas improductivamente. Los esplenocitos no fusionados mueren en un corto periodo de tiempo en cultivo. En algunas realizaciones, las células de mieloma no expresan genes de inmunoglobulina.

45 Los hibridomas que producen un anticuerpo deseado que se detectan por ensayos de cribado tales como los descritos más adelante, pueden utilizarse para producir anticuerpos en cultivo o en animales. Por ejemplo, las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio nutriente en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que las células de hibridoma secreten los anticuerpos monoclonales en el medio de cultivo. Estos métodos y medios de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Alternativamente, las células de hibridoma pueden inyectarse en el peritoneo de un animal inmunizado. Las células proliferan en la cavidad peritoneal y secretan el anticuerpo, que se acumula como fluido de ascitis. El fluido de ascitis puede extraerse de la cavidad peritoneal con una jeringuilla como fuente rica del anticuerpo monoclonal.

55 Otro método no limitante para producción de anticuerpos humanos se describe en la Patente U.S. No. 5.789.650 que describe mamíferos transgénicos que producen anticuerpos de otra especie (v.g., humanos), estando desactivados sus propios genes de inmunoglobulina endógenos. Los genes para los anticuerpos heterólogos son codificados por genes de inmunoglobulina humana. Los transgenes que contienen regiones codificantes de inmunoglobulina no reordenadas se introducen en un animal no humano. Los animales transgénicos resultantes son capaces de reordenar funcionalmente las secuencias transgénicas de inmunoglobulina y producir un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humanos. Las células B de los animales transgénicos

se immortalizan subsiguientemente por cualquiera de una diversidad de métodos, que incluyen la fusión con una línea de células immortalizantes (v.g., una célula de mieloma).

Los anticuerpos in-out contra mesotelina pueden prepararse también *in vitro* utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pero sin carácter limitante, se pueden preparar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra mesotelina utilizando 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). Adicionalmente, la Patente U.S. No. 5.798.230 describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos a partir de células B humanas productoras de anticuerpos B que están immortalizadas por infección con un virus Epstein-Barr que expresa el antígeno 2 nuclear del virus Epstein-Barr (EBNA2). El EBNA2, requerido para la immortalización, se desactiva luego dando como resultado títulos incrementados de anticuerpos.

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

En algunas realizaciones de la invención, el procedimiento para inmunización *in vitro* se complementa con evolución dirigida de las células de hibridoma en el que se introduce un alelo dominante negativo de un gen de reparación de desapareamientos tal como *PMS1*, *PMS2*, *PMS2-134*, *PMSR2*, *PMSR3*, *MLH1*, *MLH2*, *MLH3*, *MLH4*, *MLH5*, *MLH6*, *PMSL9*, *MSH1*, y *MSH2* en las células de hibridoma después de fusión de los esplenocitos, o en las células de mieloma antes de la fusión. Las células que contienen el mutante dominante negativo serán hipermutables y acumularán mutaciones a una mayor tasa que las células de control no transfectadas. Una agrupación de las células mutantes puede someterse a cribado respecto a clones que produzcan anticuerpos de mayor afinidad, o que produzcan títulos mayores de anticuerpos, o que simplemente crezcan más rápidamente o mejor en ciertas condiciones. La técnica para generación de células hipermutables utilizando alelos dominantes negativos de genes de reparación de desapareamientos se describe en la Patente U.S. No. 6.146.894, expedida el 14 de noviembre de 2000. Alternativamente, la reparación de los desapareamientos puede inhibirse utilizando los inhibidores químicos de reparación de desapareamientos descritos por Nicolaides *et al.*, en WO 02/054856 "Chemical Inhibitors of Mismatch Repair", publicado el 18 de julio de 2002. La técnica para intensificación de anticuerpos utilizando los alelos dominantes negativos de genes de reparación de desapareamientos o inhibidores químicos de reparación de desapareamientos puede aplicarse a células de expresión de mamífero que expresan asimismo genes de inmunoglobulina clonados. Las células que expresan los alelos dominantes negativos pueden ser "curadas" en el sentido de que el alelo dominante negativo puede ser desactivado, si es inducible, eliminado de la célula, etcétera, de tal modo que las células lleguen a ser genéticamente estables una vez más y ya no acumulen más mutaciones a la tasa anormalmente alta.

Cribado para especificidad de anticuerpos in-out

El cribado para anticuerpos in-out que se fijan específicamente a mesotelina puede realizarse utilizando un ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA) en el cual se recubren placas de microtitulación con antígeno inmunizante (proteína entera o péptidos). Los anticuerpos de clones que reaccionan positivamente pueden cribarse ulteriormente respecto a reactividad en un ensayo basado en ELISA para mesotelina utilizando placas de microtitulación recubiertas con mesotelina. Los clones que producen anticuerpos que son reactivos para mesotelina se seleccionan para expansión y desarrollo ulteriores. Estos anticuerpos pueden presentarse ulteriormente respecto a la fijación específica de mesotelina utilizando análisis FACS.

La confirmación de la exhibición de anticuerpos in-out reactivos con mesotelina puede realizarse, por ejemplo, utilizando un ensayo estándar de inmunofluorescencia para monitorizar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos específicos de mesotelina que exhiben actividad ADCC pueden conjugarse luego con un fluorocromo o profármaco para monitorizar la aptitud de internalizarse por visualización o la toxicidad que ocurre cuando el profármaco se internaliza y se libera del anticuerpo que conduce a la presencia de la toxina.

Composiciones Farmacéuticas de Anticuerpos

Otro aspecto de la invención caracteriza una composición farmacéutica de anticuerpos anti-mesotelina de la invención. Las composiciones farmacéuticas pueden utilizarse para inhibir o reducir el crecimiento de células mesotelina-positivas *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar 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 adicionalmente uno o más agentes y/o biomoléculas quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, el anticuerpo está conjugado al agente o biomolécula quimioterapéutica. Agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, un radionucleido, con inclusión, pero sin carácter limitante, plomo-212, bismuto-212, astato-211, yodo-131, escandio-47, renio-186,

renio-188, itrio-90, yodo-123, yodo-125, bromo-77, indio-111, y nucleidos fisionables tales como boro-10 o un actínido. En otras realizaciones, el agente es una toxina o un fármaco citotóxico, con inclusión, pero sin carácter limitante, de ricina, enterotoxina A de *Pseudomonas* modificada, calicheamicina, adriamicina, 5-fluorouracilo, y análogos.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse con un portador o medio farmacéuticamente aceptable. Portadores 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-pirrolidona. Tales preparaciones pueden esterilizarse, y en caso deseado, mezclarse con agentes adyuvantes tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes
- 10 humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, y colorantes. Portadores farmacéuticos adecuados para uso en la presente invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Pharmaceutical Sciences* (edición 17ª, Mack Pub. Co., Easton, PA).

Kits

- 15 De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit para inhibición o reducción del crecimiento de las células mesotelina-positivas, *v.g.*, células tumorales, *in vitro* o *in vivo*. Se proporcionan también kits para identificación de la presencia de células mesotelina-positivas *in vitro* o *in vivo*.

- 20 Los kits de la invención comprenden un anticuerpo o una composición de anticuerpos de la invención e instrucciones para utilización del kit en un método para inhibir o reducir el crecimiento de células mesotelina-positivas o en un método para identificación de la presencia de células mesotelina-positivas, 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 pero sin carácter limitante un agente radiactivo, fluorescente, o cromóforo (*v.g.*, ¹¹¹In-DOTA). El marcador detectable puede comprender una enzima. El kit puede comprender instrucciones y/o medios para administración del anticuerpo o la composición de anticuerpos, por ejemplo, por inyección o infusión.

- 25 Métodos de Detección de una Célula Mesotelina-Positiva

- Los métodos de la invención incluyen métodos de detección de células mesotelina-positivas, con inclusión pero sin carácter limitante de células displásicas o de cáncer que presentan mesotelina en la superficie, tales como, pero sin carácter limitante, células de cáncer de ovario, páncreas, pulmón, o mesotelioma. El método puede realizarse *in vitro* sobre una muestra biológica. Métodos de detección de células mesotelina-positivas de acuerdo con la invención
- 30 comprenden poner en contacto un anticuerpo anti-mesotelina de la invención con una muestra biológica o administrar un anticuerpo anti-mesotelina de la invención a un paciente, en donde el anticuerpo está marcado con un marcador detectable, por ejemplo pero sin carácter limitante un agente radiactivo, fluorescente, o cromóforo (*v.g.*, ¹¹¹In-DOTA), y determinar la fijación del anticuerpo a las células. Las células displásicas o de cáncer asociado con expresión incrementada de mesotelina exhibirán preferiblemente fijación incrementada del anticuerpo con relación a
- 35 las células normales. El marcador detectable puede ser una enzima.

Métodos de Reducción del Crecimiento de las Células Mesotelina-Positivas

- Los métodos son adecuados para uso en humanos y animales no humanos identificados por tener células mesotelina-positivas, por ejemplo, individuos identificados por sufrir una afección neoplásica asociada con una expresión incrementada de mesotelina. Los animales no humanos que se benefician de la invención incluyen mascotas, animales exóticos (*v.g.*, 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 está identificado por padecer un trastorno displásico que se caracteriza por expresión incrementada de mesotelina en el neoplasma en relación con los tejidos normales. Una vez que se identifica un paciente de este tipo como individuo que precisa tratamiento para dicha
- 45 condición, puede aplicarse la invención para efectuar el tratamiento de la afección. Tejidos displásicos que pueden ser tratados incluyen, pero sin carácter limitante, ovario, pulmón, páncreas, y próstata.

- Los anticuerpos in-out y derivados de los mismos pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable tal como cápsulas, tabletas, suspensiones acuosas, soluciones o análogas. Los anticuerpos y derivados de los mismos se pueden administrar también por vía parenteral, por ejemplo, por las rutas de
- 50 administración siguientes: técnicas de inyección e infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intranasal, tópica, intratecal, intrahepática, intralesional, y intracraneal. Por regla general, los anticuerpos y derivados se proporcionarán como una inyección intramuscular o intravenosa.

- Los anticuerpos in-out y derivados de la invención se pueden administrar solos o con un portador farmacéuticamente aceptable, con inclusión de adyuvantes, vehículos y excipientes aceptables, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.
- 55

La dosis eficaz dependerá de una diversidad de factores y está plenamente dentro del ámbito de un médico experto el ajuste de la dosis para un paciente dado de acuerdo con diversos parámetros tales como peso corporal, el objetivo de tratamiento, la dosis máxima tolerada, la formulación específica utilizada, la ruta de administración y análogos. Generalmente, son adecuados niveles de dosificación comprendidos entre aproximadamente 0,001 y 5 aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día del anticuerpo o derivado del mismo, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día, aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal/día a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal/día, o aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal/día a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día. La dosificación puede realizarse en forma de bolus o de infusión. Las dosis pueden administrarse una sola vez al día o múltiples veces a lo largo de un día. Adicionalmente, las dosis 10 pueden administrarse múltiples veces durante un periodo de tiempo. Las dosis pueden administrarse cada 1-14 días. Los anticuerpos o derivados de los mismos se pueden administrar como una dosis de aproximadamente 3 a 1 mg/kg i.p. o aproximadamente 5 a 12,5 mg/kg i.v. Los anticuerpos o derivados de los mismo pueden proporcionarse de tal manera que se mantenga un nivel en plasma de al menos aproximadamente 1 µg/ml.

El tratamiento eficaz puede evaluarse de diversas maneras. El tratamiento eficaz puede determinarse por una 15 progresión ralentizada de crecimiento del tumor. El tratamiento eficaz puede estar marcado por contracción del tumor (es decir, disminución del tamaño del tumor), por inhibición de metástasis del tumor, o por aumento del bienestar del paciente con inclusión de signos tales como aumento de peso, recuperación de fuerza, disminución del dolor, desarrollo, e indicaciones subjetivas de mejor estado de salud del paciente.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse antes, después, o simultáneamente con otro agente 20 terapéutico o de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos in-out de la invención pueden administrarse solos o con un agente citotóxico tal como, pero sin carácter limitante, adriamicina, doxorubicina, gemcitabina, o 5-fluorouracilo. Los anticuerpos in-out de la invención se pueden administrar solos o con un agente citostático tal como, pero sin carácter limitante, tarceva y avastina. Los anticuerpos in-out y derivados de la invención se pueden administrar solos o con un agente de vacunación. Los anticuerpos in-out y derivados de la invención se pueden administrar solos o 25 con otra biomolécula tal como, pero sin carácter limitante, interleuquina-2, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, rituxán, zevalina, herceptina, erbitux, y avastina.

Los anticuerpos in-out y derivados de la invención se pueden administrar como una mixtura homogénea de anticuerpo no conjugado o conjugado o como una mixtura heterogénea de anticuerpo in-out no conjugado y conjugado.

Los ejemplos que siguen se proporcionan para ilustrar la presente invención, y no deben interpretarse como 30 limitantes de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1. Anticuerpos in-out que pueden fijarse a mesotelina

El anticuerpo monoclonal MSAb-1 fue desarrollado por clonación del dominio variable de un fragmento Fab de 35 mesotelina para la región constante humana IgG1. Se demostró que el anticuerpo se fijaba específicamente a la proteína mesotelina y a células de cáncer que expresan mesotelina y se encontró que tiene una constante de fijación de 2 nM utilizando BIACORE. MSAb-2 y MSAb-3 son variantes de MSAb-1 que tienen diferentes secuencias de nucleótidos y aminoácidos dentro de sus regiones variables respectivas. Para demostrar la fijación específica de mesotelina, se realizaron ensayos ELISA utilizando mesotelina recombinante en un formato de 96 pocillos siguiendo 40 métodos utilizados por los expertos en la técnica. Los anticuerpos que se encontró reaccionaban por ELISA se analizaron ulteriormente respecto a fijación de mesotelina utilizando análisis FACS siguiendo el protocolo del fabricante. En la Figura 1 se muestran datos representativos del análisis FACS por los cuales las células de tumor de ovario y páncreas que expresaban mesotelina eran positivas respecto a fijación de MSAb-1 en contraste con las células nulas (A549).

45 Ejemplo 2. Actividad inmunoefectora de MSAb-1

La actividad del anticuerpo in-out MSAb-1 para actividad inmunoefectora se evaluó por ensayos de citotoxicidad celular estándar dependientes de anticuerpos (ADCC) en la línea de células OVCAR-3 expresantes de mesotelina. Resumidamente, se sembraron las células diana OVCAR-3 en microplacas de 96 pocillos con fondo plano en medio de crecimiento completo (RPMI-1640 que contenía 10% FBS, y 2 mM L-glutamina). Al día siguiente, se reemplazó el 50 medio completo con 100 µl de medio CHO-CD exento de suero (Sigma), se añadieron a las células diana 50µl de medio acondicionado que contenía el anticuerpo y se incubó durante 20 minutos a 37°C. Subsiguientemente, se añadieron 100 µl de medio exento de suero que contenía 2×10^5 células efectoras a cada pocillo y se incubaron las células durante 5-6 horas a 37°C, 5% CO₂. Las células efectoras se derivaban de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) aisladas de donantes sanos (adquiridas de Interstate Blood Bank). Antes del uso en 55 ensayos ADCC, las PBMCs se activaron por siembra de PBMCs a $2,5 \times 10^6$ /ml en RPMI completo que contenía 10 ng/ml de interleuquina 2 humana recombinante (R&D Systems) durante 3 días a 37°C, 5% de CO₂. Las PBMCs activadas se añadieron luego a células OVCAR-3 con una ratio de células efectoras:células diana de 5:1 y los cultivos se incubaron durante 5-6 horas a 37°C, con 5% de CO₂. Se recogió luego el sobrenadante de cada pocillo,

se transfirió a placas ELISA y se analizó respecto a actividad ADCC como sigue. La actividad ADCC se monitorizó por liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH), una enzima endógena utilizada para medir ADCC en ensayos estándar. La LDH se monitorizó por adición de 100µl de sustrato de LDH (Roche), un producto químico que cuando es convertido por LDH es detectable espectrofotométricamente a DO₄₉₀, al sobrenadante y se incubó 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. Se obtuvo espectrofotométricamente la densidad óptica a 490 nm (OD₄₉₀). Se añadió 2% de Triton X a las células diana sólo como un control positivo "max", mientras que las células diana con PBMC y sin anticuerpo alguno sirvieron como control negativo "espontáneo". Se obtuvieron los valores LDH y se determinó el porcentaje de toxicidad con la fórmula: (valor muestra - espontáneo)/(max - espontáneo) x 100%, donde 'espontáneo' = lisis de las células diana en ausencia de células efectoras y 'max' = lisis de las células diana en presencia de 2% de Triton. La citotoxicidad suscitada por 100 ng/ml de MORAb-A92 (proteína A purificada), un anticuerpo de control isotipo, se utilizó como control positivo. La citotoxicidad inespecífica se monitorizó utilizando 100 ng/ml de anticuerpo IgG1 humano normal. La ratio obtenida dividiendo el % de citotoxicidad por la concentración del anticuerpo para cada pocillo/clon (es decir ratio = 50 (%)/100 (ng/ml) = 0,5%) se estableció como criterio para seleccionar los clones líderes con función efectora potencialmente mejorada.

El análisis de MSAb-1 muestra la capacidad para mejorar la actividad ADCC (p = 0,018) sobre las células incubadas con Ig de control o sin anticuerpo alguno (Figura 2). Estos datos respaldan el descubrimiento de que MSAb-1 posee efectos citotóxicos por la función inmunofectora .

Ejemplo 3. Internalización de MSAb-1

MSAb-1 se internaliza cuando se fija a células que expresan mesotelina. Este descubrimiento se demuestra en la Figura 1 utilizando el ensayo Hum-ZAP. Las segundas inmunotoxinas son conjugaciones de un anticuerpo secundario a la proteína desactivadora de ribosomas saporina. Si el anticuerpo primario que se testa está internalizado, la saporina se transporta a la célula por su fijación al anticuerpo secundario. Una vez internalizada, la saporina se separa de su conjugado de IgG, inhibe la síntesis de proteínas, y finalmente causa la muerte celular. Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems, Cat #IT-22) es un conjugado químico secundario de IgG anti-humana de cabra purificada por afinidad, (mw 210 kDa) que reconoce los anticuerpos monoclonales humanos. La molécula de control, IgG de cabra-SAP (Advanced Targeting Systems, Cat #IT-19) es un conjugado de IgG de cabra normal y saporina. Resumidamente, las células se extendieron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con fondo plano a 2500/pocillo en 80 µl de RPMI 1640 con 10% de FCS, glutamina 2,0 mM, piruvato de sodio 1,0 mM, y amínoácidos no esenciales MEM 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 a 100 µl. Se realizaron experimentos con titulaciones de anticuerpos e incluyen anticuerpos primarios y secundarios solos como control. Cuatro días después, se evaluó la viabilidad celular utilizando el Ensayo de Citotoxicidad Promega CellTiter® (Cat #G3581) que lee el número de células viables por espectrofotometría. Todos los tests se realizaron por triplicado. Los datos se evaluaron por comparación de los pocillos tratados y sin tratar, y los resultados se expresan como porcentaje del control. Como se muestra en la Figura 3, las células OVCAR-3, que sobreexpresan mesotelina (triángulo) mueren después del tratamiento con MSAb-1 conjugado con toxina en comparación con el anticuerpo ML1 de control isotipo conjugado con toxina y no conjugado (rombo y cuadrado, respectivamente) y con MSAb-1 no conjugado (X). En contraste, el conjugado MSAb-1/toxina no produce citotoxicidad alguna sobre las células TP carentes de mesotelina en comparación con el anticuerpo conjugado con ML1 de control positivo que reconoce un antígeno de la superficie celular expresado en las células TP.

Sumario

En suma, los anticuerpos anti-mesotelina de la invención son capaces de suscitar ADCC pero se internalizan en las células mesotelina-positivas. Los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento de células tumorales mesotelina-positivas sea como un agente aislado o en terapia de combinación.

Listado de secuencias

- <110> Morphotek Inc.
Ebel, Wolfgang
Grasso, Luigi
- 5 Nicolaides, Nicholas
sars, Philip M.
Routhier, Eric
- <120> Anticuerpos anti-mesotelina
- <130> MOR-0581
- 10 <150> US 60/660,177
<151> 10-03-2005
- <160> 12
- <170> Patentin version 3.3
- <210> 1
- 15 <211> 1407
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido
- 20 <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 atgggtgcttc tagctacaac      240
cagaagttca ggggcaaggc cacattaact gtagacaagt catccagcac agcctacatg      300
gacctcctca gtctgacatc tgaagactct gcagtctatt tctgtgcaag gggggggttac      360
gacgggaggg gttttgacta ctggggatcc gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc      420
accaagggcc catcgggtctt 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 agaaagtga gcccaaatct      720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      780
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc      840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac     1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc     1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc     1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggettct atcccagcga catcgccgtg     1200

```

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
 tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
 agcctctccc tgtctccccg gaaatga 1407

<210> 2

<211> 468

<212> PRT

5 <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

ES 2 429 340 T3

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

5 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 3

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acactcggac      60
atcgagctca ctcagttctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg      120
acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggg accagcagaa gtcaggcacc      180
tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactggctt ctggagtccc aggtcgcttc      240
agtggcagtg ggtctggaac ctcttactct ctcaaatca gcagcgtgga ggctgaagat      300
gatgcaactt attactgcca gcagtggagt aagcaccctc tcacgttcgg atccgggacc      360
aagtggaaga tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcattctccc gccatctgat      420
gagcagttga aatctggaac tgcctctggt 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 gagtggtaat      700
    
```

10 <210> 4
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo Sintético

15 <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
5 <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 acagggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggacttatt actccttaca atggtgcttc tagctacaac 240
cagaagttca ggggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggggggttac 360
gacgggaggg gttttgacta ctggggatcc gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggctct ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg_ tctacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 660
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagttga gcccaaactc 720
 tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
 aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gccccatcg 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

5 <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

ES 2 429 340 T3

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
5 <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 ctggcgtecc agccaggttc      240
agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctcaccatca gcagcctaga gcctgaagat      300
tttgcagttt attactgtca gcagtggagt aagcaccctc tcacgttcgg atccgggacc      360
aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatttccc gccatctgat      420
gagcagttga aatctggaac tgcctctggt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga      480
gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt      540
gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc      600
aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgccaag tcacccatca gggcctgagc      660
tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaa      699
    
```

10 <210> 8
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <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

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 9

ES 2 429 340 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagccag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120
 tgcaaggcat ctggttactc attcactggc tacaccatga actgggtgaa gcaggcccct 180
 ggacaagggc ttgagtggat tggacttatt actccttaca atgggtgcttc tagctacaac 240
 cagaagttca ggggcaaggc caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 300
 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt tctgtgagag aggggggttac 360
 gacgggaggg gttttgacta ctgggggatcc gggaccccg gtcaccgtctc ctcagcctcc 420
 accaagggcc catcggctct ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacggt gtcgtggaac 540
 tcaggcggcc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 660
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagttga gcccaaactc 720
 tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
 aagtgaagg tctccaacaa agccctcca gccccatcg agaaaacat 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

5 <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

5

<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 agccagggtc 240
 agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctccacatca gcagcctaga gcctgaagat 300
 tttgcagttt attactgtca gcagtggagt aagcaccctc tcacgttcgg atccgggacc 360
 aagggtgaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcattctccc gccatctgat 420
 gagcagttga aatctggaac tgcctctggt 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

5 <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 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 fija específicamente a mesotelina, comprendiendo dicho anticuerpo una cadena pesada expresada recombinantemente por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera expresada recombinantemente por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 3, una
- 5 2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo está conjugado a un agente quimioterapéutico.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho agente quimioterapéutico comprende un radionucleido.
4. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador
- 15 5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un agente quimioterapéutico.
6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente una enzima, una proteína, un péptido, un aminoácido, un ácido nucleico, un lípido o un carbohidrato.
- 20 7. Una célula que produce el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Un método de producción de un anticuerpo que se fija específicamente a mesotelina y es capaz de suscitar a la vez una actividad inmunoefectora e internalizarse con las células mesotelina-positivas, comprendiendo el método los pasos de cultivar la célula de la reivindicación 7 y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.
9. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, para uso en la inhibición del crecimiento de células
- 25 10. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las células displásicas son células de carcinoma de ovario, células de adenocarcinoma pancreático, células de mesotelioma, células de carcinoma de pulmón, o células de cáncer de próstata.
11. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el individuo es un humano.
- 30 12. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo no conjugado o una mezcla de un anticuerpo no conjugado y un anticuerpo conjugado a un agente quimioterapéutico.
13. El uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3 para la preparación de un medicamento para uso en la inhibición del crecimiento de células displásicas mesotelina-positivas en un individuo.
- 35 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo es un anticuerpo no conjugado o una mezcla de un anticuerpo no conjugado y un anticuerpo conjugado a un agente quimioterapéutico.
15. Un kit para uso en un método para inhibición del crecimiento de células tumorales en un individuo o para identificación de la presencia de células displásicas mesotelina-positivas *in vitro* o *in vivo*, en donde el kit comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
- 40 16. Un kit de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende adicionalmente al menos un reactivo quimioterapéutico o citotóxico, o al menos un reactivo de diagnóstico.
17. Un kit de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende adicionalmente medios e instrucciones para administrar el anticuerpo al individuo.
- 45 18. Un método de detección de una célula displásica que presenta mesotelina en su superficie, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con el anticuerpo de la reivindicación 1 y determinar la fijación de dicho anticuerpo a dicha célula.
19. Un método de detección de mesotelina o un fragmento de la misma en la superficie de una célula displásica, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la reivindicación 1, y determinar la fijación de dicho anticuerpo a dicha mesotelina o fragmento de la misma.

20. Un método de detección de mesotelina o un fragmento de la misma en una muestra biológica, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo de la reivindicación 1, y determinar la fijación de dicho anticuerpo a mesotelina o un fragmento de la misma.
- 5 21. Un método de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, en donde dicha célula displásica es una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer de pulmón, o una célula de mesotelioma.
22. Un método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicha muestra biológica es una muestra biológica de un individuo que padece cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, o mesotelioma.
23. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en donde dicho anticuerpo está marcado con un marcador detectable.
- 10 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, 19, 21 ó 23, que comprende detectar dicha célula displásica *in vitro*.
25. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el individuo es humano.

Figura 1

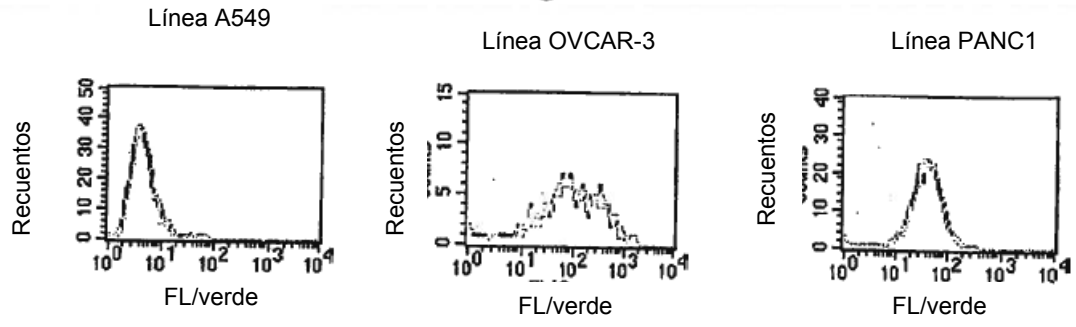


Figura 2

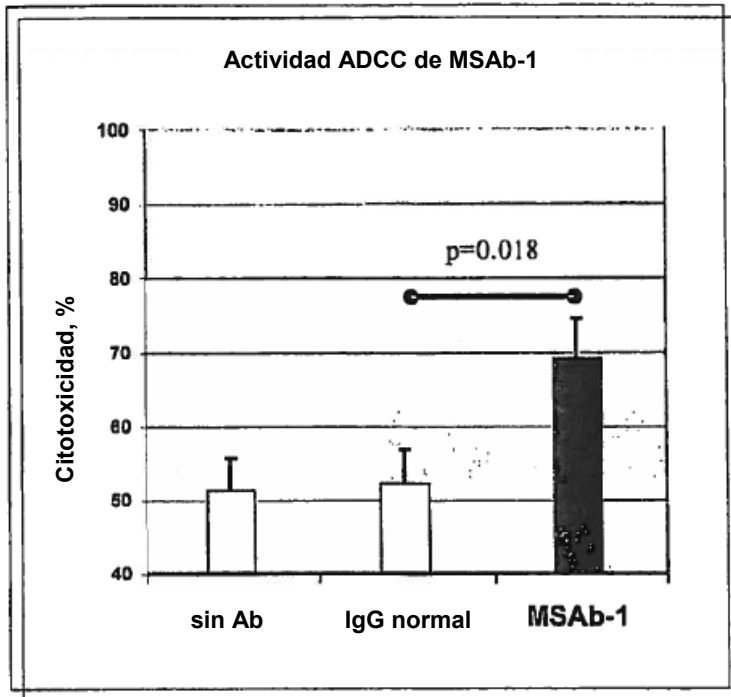


Figura 3

