

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 355**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2008 E 08836490 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2195017**

54 Título: **Anticuerpos humanos que se adhieren a mesotelina, y usos de los mismos**

30 Prioridad:

01.10.2007 US 976626 P
30.11.2007 US 991692 P
01.07.2008 US 77397 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.01.2015

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

TERRETT, JONATHAN A.;
POGUE, SARAH L.;
TOY, KRISTOPHER;
YANG, LAN;
RAO-NAIK, CHETANA y
CHEN, BINGLIANG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 526 355 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 humanos que se adhieren a mesotelina, y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la Invención**

La mesotelina es una glicoproteína que está presente en la superficie de las células del recubrimiento mesotelial de las cavidades corporales peritoneal, pleural y pericardial. Originalmente se purificó a partir de la línea de célula de cáncer pancreático humano HPC-Y5 y se demostró que tenía capacidad potenciadora de megacariocitos y por lo tanto se denominó factor potenciador de megariocitos (MPF) (Yamaguchi *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:805-808). El ADNc de mesotelina fue clonado de una genoteca preparada a partir de la línea de células HPC-Y5 (Kojima *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:21984-21990). El ADNc fue también clonado usando el anticuerpo monoclonal K1, que reconoce los mesoteliomas (Chang y Pastan (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:136-40). Estructuralmente, la mesotelina se expresa en la superficie de las células como un polipéptido precursor de 60 kDa, el cual es procesado proteolíticamente en un componente escindido de 31 kDa (correspondiente a MPF) y un componente adherido a membrana de 40 kDa (Hassan *et al.* (2004) *Clin. Cancer. Res.* 10:3937-3942).

Además de estar expresada en células mesoteliales normales, la mesotelina está hiperexpresada en varios tipos de tumores humanos incluyendo todos los mesoteliomas, muchos cánceres de ovario y pancreáticos, y algunos cánceres de estómago, pulmón y endometrio. Por ejemplo, la mesotelina se expresa en aproximadamente 70 % de todos los cánceres de ovario, aproximadamente 82 % de adenocarcinomas papilares, serosos, aproximadamente 83 % de todos los adenocarcinomas pancreáticos y aproximadamente el 86 % de todos los adenocarcinomas pancreáticos ductales

Se han preparado ratones mutantes en los cuales el gen de mesotelina fue disociado por recombinación homóloga (Bera, T.K. y Pastan, I. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20:2902-2906). No se detectó ninguna anomalía anatómica, hematológica o reproductiva, lo cual indica que la función mesotelina no es esencial para el crecimiento o reproducción, por lo menos en aquellos ratones.

La mesotelina interactúa específicamente con CA125 (conocida también como MUC-16), una glicoproteína de tipo mucina que está presente en la superficie de las células tumorales que fueron previamente identificadas como un antígeno de cáncer de ovario. Además, la adhesión de CA125 a mesotelina adherida a membrana actúa como intermediaria en la adhesión de células heterotípicas, y CA125 y mesotelina están co-expresadas en adenocarcinoma de ovario de un grado avanzado (Rump, A. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:9190-9198). La expresión de mesotelina en el recubrimiento del peritoneo está correlacionada con el sitio preferido de formación de metástasis del cáncer de ovario y se cree que la adhesión de mesotelina-CA125 facilita la metástasis peritoneal de los tumores de ovario (Gubbels, J.A. *et al.* (2006) *Mol. Cancer* 5:50).

La técnica anterior desvela un anticuerpo monoclonal, K1, que se une con mesotelina (Chang *et al.* (1992) *Cancer Research* 52: 181-186; Brinkman *et al.* (1997) *Int. J. Cancer* 71: 638-644; Li *et al.* (2004) *Anticancer Research* 24: 1327-1335; Hassan *et al.* (2000) *J. Immunotherapy* 23(4): 473-479 y Chowdhury *et al.* (1998) *PNAS USA* 95: 669-674). Además el documento WO99/28471 desvela un sc-Fv que se une con mesotelina.

En vista de lo que antecede, son interesantes los agentes adicionales para modular la actividad de mesotelina

45 **Compendio**

La presente descripción provee anticuerpos monoclonales aislados, en particular, humanos, que se adhieren específicamente a mesotelina y que tienen propiedades deseables tales como adhesión de elevada afinidad con la mesotelina humana, internalización por las células que expresan mesotelina, inhibición de la adhesión de mesotelina a CA125, y/o intermediación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos de la invención pueden usarse, por ejemplo, para detectar mesotelina o para inhibir el crecimiento de células que expresan mesotelina tales como células tumorales que expresan mesotelina.

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de adhesión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano que se adhiere a mesotelina humana y comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 2;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 5;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 8;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 11;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 14; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 17, o
- (a') una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 3;
- (b') una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 6;
- (c') una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 9;

- (d') una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 12;
- (e') una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 15; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 18.

5 Un anticuerpo particularmente preferido, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 2;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 5;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 8;
- 10 (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 11;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 14; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 17.

15 Otro anticuerpo particularmente preferido, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 3;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 6;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 9;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 12;
- 20 (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 15; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 18.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o a una porción de éste de adhesión al antígeno, que comprende:

- 25 (i) (a) una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 20; y (b) una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 23.
- (ii) (a) una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 21; y (b) una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 24.
- 30

Los anticuerpos de esta descripción pueden ser, por ejemplo, de un isotipo IgG1 o IgG4. Alternativamente, pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos de cadena única.

Esta invención provee también un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o una parte de unión a antígeno del mismo, ligado a una molécula asociada, en el que el conjugado de molécula compañero es un agente terapéutico que está conjugado con el anticuerpo por un enlazador químico. Se describen en el presente documento inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo de la invención, o una parte de unión a antígeno del mismo, ligada con el Compuesto Citotoxina A, que se identifica a continuación aquí, y que ha sido discutido en la 2008/083312. La invención provee los siguientes inmunoconjugados preferidos, que comprenden Citotoxina A ligada a un anticuerpo de esta invención, donde el anticuerpo (i) compite por entrecruzamiento con el Anticuerpo de Referencia (a), (b), o (c) para la adhesión a un epítipo de mesotelina humana; (ii) de acuerdo con la Realización A; (iii) de acuerdo con la Realización B; o (iv) de acuerdo con la Realización C. Algunos de estos conjugados de anticuerpo-molécula asociada son capaces de ser internalizados en células que expresan mesotelina y que son capaces de intermediar en ADCC.

45 Dichos conjugados de anticuerpo-molécula asociada pueden estar conjugados a través de ligadores químicos. En algunas realizaciones, el ligador es un ligador peptídico, y está descrito aquí como $(L^4)_p-F-(L^1)_m$. Otros ligadores incluyen hidrazina y ligadores disulfuro, y se describen aquí como $(L^4)_p-H-(L^1)_m$ o $(L^4)_p-J-(L^1)_m$, respectivamente. Además de los ligadores que están unidos al asociado, pueden usarse brazos ligadores disociables que son apropiados para la unión a esencialmente cualquier especie molecular.

Esta descripción provee también una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno de éste, de esta descripción, ligada a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de adhesión diferente a la de dicho anticuerpo, o una parte de unión a antígeno de éste.

55 También se proveen composiciones que comprenden un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno de estos, o un inmunoconjugado de esta invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones de adhesión al antígeno de éstos, de esta invención, están también abarcadas por esta invención, así como también los vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos y células huésped que comprenden dichos vectores de expresión. Se desvelan también métodos para preparar anticuerpos anti-mesotelina usando las células huésped que comprenden dichos vectores de expresión y pueden incluir las etapas de (i) expresar el anticuerpo en la célula huésped y (ii) aislar el anticuerpo de la célula huésped.

65 Se describe un método para preparar un anticuerpo anti-mesotelina, El método comprende:

- (a) proveer: (i) una secuencia de anticuerpo V_H que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 1–3, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 4–6, y/o una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 7–9; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de V_L que comprende una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 10–12, una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 13–15, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 16–18;
- (b) alterar por lo menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo V_H y/o la secuencia de anticuerpo de V_L para crear por lo menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
- (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo–molécula de la invención, para su uso en el tratamiento de un cáncer caracterizado por células que expresan mesotelina. Los cánceres particularmente preferidos para tratamiento son mesoteliomas, cánceres pancreático, cánceres de ovario, cánceres de estómago, cánceres de pulmón, o cánceres endometriales. En una realización más, el cáncer de debe ser tratado está seleccionado del grupo que consiste en mesoteliomas, adenocarcinomas papilares serosos de ovario, carcinomas de ovario de células claras, carcinoma de ovario mulerianos mixto, carcinomas de ovario mucinosos endometrioides, adenocarcinomas pancreáticos, adenocarcinomas pancreáticos ductales, carcinomas serosos uterinos, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas ductales biliares extrahepáticos, adenocarcinomas gástricos, adenocarcinomas esofágicos, adenocarcinomas colorrectales y adenocarcinomas de mama.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1A muestra el nucleótido (SEC ID NO: 25) y las secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 19) de la V_H del anticuerpo monoclonal humano 3C10. Las regiones CDR1 (SEC ID NO: 1), CDR2 (SEC ID NO: 4) y CDR3 (SEC ID NO: 7) están delineadas.

La Figura 1B muestra el nucleótido (SEC ID NO: 28) y las secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 22) de la V_L del anticuerpo monoclonal humano 3C10. Las regiones CDR1 (SEC ID NO: 10), CDR2 (SEC ID NO: 13) y CDR3 (SEC ID NO: 16) están delineadas.

La Figura 2A muestra el nucleótido (SEC ID NO: 26) y las secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 20) de la región V_H del anticuerpo monoclonal humano 6A4. Las regiones CDR1 (SEC ID NO: 2), CDR2 (SEC ID NO: 5) y CDR3 (SEC ID NO: 8) están delineadas.

La Figura 2B muestra el nucleótido (SEC ID NO: 29) y las secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 23) de la V_L del anticuerpo monoclonal humano 6A4. Las regiones CDR1 (SEC ID NO: 11), CDR2 (SEC ID NO: 14) y CDR3 (SEC ID NO: 17) están delineadas.

La Figura 3A muestra el nucleótido (SEC ID NO: 27) y las secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 21) de la V_H del anticuerpo monoclonal humano 7B1. Las regiones CDR1 (SEC ID NO: 3), CDR2 (SEC ID NO: 6) y CDR3 (SEC ID NO: 9) están delineadas.

La Figura 3B muestra el nucleótido (SEC ID NO: 30) y las secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 24) de la V_L del anticuerpo monoclonal humano 7B1. Las regiones CDR1 (SEC ID NO: 12), CDR2 (SEC ID NO: 15) y CDR3 (SEC ID NO: 18) están delineadas.

La Figura 4 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la V_{HS} del 3C10 (SEC ID NO: 19) y 6A4 (SEC ID NO: 20) con la secuencia de aminoácidos 3–33 de V_H 3–33 de línea germinal humana (SEC ID NO: 31).

La Figura 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la V_L s de la 3C10 (SEC ID NO: 22) y 6A4 (SEC ID NO: 23) con la secuencia de aminoácidos L6 de V_k de línea germinal humana (SEC ID NO: 33).

La Figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la V_H de 7B1 (SEC ID NO: 21) con la secuencia de aminoácidos 3–7 V_H de línea germinal humana (SEC ID NO: 32).

La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la V_L de 7B1 (SEC ID NO: 24) con la secuencia de aminoácidos A27 de V_k de línea germinal humana (SEC ID NO: 34).

La Figura 8 muestra los resultados de un ensayo de adhesión de célula de cáncer de ovario OVCAR3.

Las Figuras 9A y 9B muestran los resultados de un estudio *in vivo* usando un modelo de ratón de xenoinjerto en NCI–H226 (mesotelioma de pulmón).

Las Figuras 10A y 10B muestran los resultados de un estudio *in vivo* usando un modelo de ratón de xenoinjerto HPAC (carcinoma pancreático humano).

La Figura 11 es un gráfico que muestra que los volúmenes del tumor de cáncer de ovario se redujeron en un inmunoconjugado de esta invención en un modelo de xenoinjeto de cáncer de ovario en ratón.

La Figura 12 muestra la ADCC de células de cáncer de ovario (células OVCAR3, Figura 12a) y células NSCLC (células H226, Figura 12b) mediante un anticuerpo no fucosilado de esta invención.

Descripción detallada de esta Descripción

La presente descripción se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, particularmente los humanos, que se adhieren a mesotelina humana y que tienen propiedades deseables. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de esta descripción derivan de secuencias particulares de línea germinal de cadena pesada y cadena ligera y/o comprenden características estructurales particulares tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácido particulares. Esta descripción provee anticuerpos aislados, métodos para preparar dichos anticuerpos,

conjugados de anticuerpo–molécula asociada, y moléculas biespecíficas que comprenden dichos anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen tales anticuerpos, conjugados de anticuerpos–molécula asociada, o moléculas biespecíficas. Asimismo, se proveen varias alternativas tales como anticuerpos homólogos, anticuerpos con modificaciones conservadoras, anticuerpos modificados y manipulados, fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos, cada uno de los cuales está descrito a continuación. Esta descripción se refiere también a métodos de uso de los anticuerpos, para detectar la proteína mesotelina, así como también métodos de uso de anticuerpos anti–mesotelina de la invención para inhibir el crecimiento de células que expresan mesotelina, tales como células tumorales. Por consiguiente, esta descripción provee también métodos de uso de anticuerpos anti–mesotelina de esta descripción para tratar varios tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer endometrial y mesotelioma. Preferiblemente el anticuerpo, el conjugado, la molécula biespecífica, alternativa o variante tiene una o más de estas propiedades: adhesión a mesotelina humana, internalización mediante células que expresan mesotelina, inhibición de adhesión de mesotelina a CA125, intermediación de ADCC contra células que expresan mesotelina e inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan mesotelina *in vivo*. Los anticuerpos pueden ser humanos (preferiblemente), humanizados o quiméricos

Para que la presente descripción pueda comprenderse mejor, se definirán primero ciertos términos. Se indican definiciones adicionales a través de toda la descripción detallada.

El término “mesotelina” incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para una proteína de mesotelina humana pueden, en ciertos casos, tener una reacción cruzada con una proteína de mesotelina de una especie distinta de la humana. En otras realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para la proteína mesotelina humana y no exhibir especies u otros tipos de reactividad cruzada o de reacción cruzada con mesotelina de ciertas otras especies, pero no de todas las otras especies (por ejemplo, reacción cruzada con una mesotelina de primate pero no con mesotelina de ratón). El término “mesotelina humana”, se refiere a una secuencia de mesotelina tal como la secuencia completa de aminoácido de mesotelina humana que tiene el Número de Acceso Genbank NP_005814. El término “mesotelina de ratón” se refiere a mesotelina de una secuencia de ratón tal como una secuencia de aminoácidos completa de mesotelina de ratón que tiene el Número de Acceso Genbank NP_061345. La porción N–terminal de mesotelina se conoce por lo tanto como factor potenciador de megariocitos (MPF). La frecuencia de mesotelina humana puede diferir de la mesotelina humana del Número de Acceso de Genbank NP_005814 porque tiene, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y la mesotelina tiene sustancialmente la misma función biológica que la mesotelina humana del Número de Acceso de Genbank NP_005814, tal como adhesión a CA125.

Una secuencia de mesotelina humana particular será generalmente por lo menos 90 % idéntica en secuencia de aminoácidos a la mesotelina humana del Número de Acceso Genbank NP_005814 y contiene residuos de aminoácido que identifican la secuencia de aminoácidos como secuencia humana cuando se comparan con las secuencias de aminoácido de mesotelina de otras especies (por ejemplo, murina). En ciertos casos, una mesotelina humana puede ser por lo menos 95 %, o incluso por lo menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica en la secuencia de aminoácidos a la mesotelina del Número de Acceso a Genbank NP_005814. En ciertas realizaciones, una secuencia de mesotelina humana no exhibirá más de 10 diferencias de aminoácidos desde la secuencia de mesotelina de Número de Acceso de Genbank NP_005814. En ciertas realizaciones, la mesotelina humana puede exhibir no más de 5 o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido de la secuencia de mesotelina de Número de Acceso de Genbank NP_005814. El porcentaje de identidad puede determinarse tal como se describe aquí.

El término “CA125” se refiere a un antígeno de carcinoma de ovario, o a un marcador de tumor de cáncer de ovario, que se conoce también como MUC–16. El término “CA125 humano” se refiere a una secuencia de CA125 humano tal como la secuencia de aminoácidos completa de CA125 que tiene un Número de Acceso a Genbank NP_078966. La secuencia CA125 humano puede diferir de la CA125 del Número de Acceso de Genbank NP_078966 por tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones de regiones no conservadas. Una secuencia CA125 humano particular será generalmente por lo menos 90 % idéntica en secuencia de aminoácidos a CA125 humano de Número de Acceso de Genbank NP_078966 y contiene residuos de aminoácido que identifican la secuencia de aminoácidos como humana cuando se compara con secuencias de aminoácido CA125 de otras especies (por ejemplo, murinas). En ciertos casos, una CA125 humana puede ser de por lo menos 95 %, o incluso por lo menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica en secuencias de aminoácido a CA125 de Número de Acceso a Genbank NP_078966. En ciertas realizaciones, una secuencia CA125 humana no exhibirá más de 10 diferencias de aminoácido de la secuencia CA125 de Número de Acceso a Genbank NP_078966. En ciertas realizaciones la CA125 puede exhibir no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácido de la secuencia CA125 de Número de Acceso a Genbank NP_078966. El porcentaje de identidad puede determinarse tal como se describe aquí.

El término “respuesta inmunitaria” se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complementos) que dan como resultado un daño selectivo, la destrucción o la eliminación desde el cuerpo humano, de los patógenos invasores, de las células o tejidos infectados con patógenos, de las células cancerosas, o en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales. Una “vía de transducción de señales” se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de señales que cumplen una función en la transmisión de una señal desde una porción de una

célula a otra porción de una célula. La frase “receptor superficial de células” incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir una señal a través de la membrana de plasma de una célula. Un ejemplo de un “receptor superficial de células” es mesotelina humana.

5 El término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos enteros y a cualquier fragmento de adhesión al antígeno (“parte de unión a antígeno”), o cadenas únicas de los mismos. Un “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (que se abreviará aquí como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está
10 constituida por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviado aquí como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está constituida por un dominio, C_L . V_H y V_L pueden estar adicionalmente subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), interdispersadas con regiones que son más conservadas, que se denominan regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs,
15 dispuestas desde el amino-terminal hasta el carboxi-terminal en el orden siguiente FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de adhesión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden intermediar en la adhesión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo células efectoras), y el primer componente (Clq) del sistema complementario clásico.

20 El término “fragmento de anticuerpo” y “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (simplemente “porción de anticuerpo”), tal como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de adherirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, mesotelina). Se ha demostrado que la función de adhesión al antígeno, puede llevarse a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Ejemplos de fragmentos de
25 adhesión abarcados dentro del término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento divalente que comprende dos fragmentos Fab ligados mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento de Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (ver FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3ª ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (v) un fragmento
30 Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un brazo único de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544–546), que consiste en un dominio V_H ; (vii) una región determinante de complementariedad aislada (CDR); y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un dominio variable único y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, con un ligador sintético que les permite que
35 estén preparados como cadena proteínica única en la cual las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena única Fv (scFv); ver, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423–426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879–5883). Dichos anticuerpos de cadena única están también abarcados dentro del término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos son rastreados
40 para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un “anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se adhiere específicamente a mesotelina está sustancialmente libre de anticuerpos que se adhieren específicamente a otros antígenos). Un
45 anticuerpo aislado que se adhiere específicamente a mesotelina puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de mesotelina de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” se refieren a la preparación de
50 moléculas de anticuerpos de una composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe una especificidad de adhesión única y afinidad para un epítipo particular.

El término “anticuerpo humano” se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones estructurales como las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.
55 Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas aleatoriamente por mutagénesis *in vitro* en forma aleatoria o específica para un sitio o por mutación somática *in vivo*) en un sitio específico o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, “anticuerpo humano” no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, han sido injertadas en secuencias de estructura humana.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que exhiben especificidad de adhesión única, los cuales tienen regiones variables en las cuales, tanto las regiones de estructura como de CDR derivan de
65 secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización se producen anticuerpos monoclonales mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por

ejemplo un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana transgénica y un transgen de cadena ligera fusionada a una célula inmortalizada.

5 El término “anticuerpo humano recombinante”, tal como usa aquí, incluye todos los anticuerpos humanos que están preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosomal para genes de inmunoglobulina humana o un
10 hibridoma preparado a partir del mismo (descrito a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una genoteca de anticuerpo humano combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos, preparados,
15 expresados, creados o aislados mediante cualquier otra forma que involucra el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales la estructura y las regiones de CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden estar sujetos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácido de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con las secuencias de línea germinal humana de las secuencias V_H y V_L, no pueden existir en forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

20 El término “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por los genes de región constante de cadena pesada.

Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan intercambiamente con “un anticuerpo que se adhiere específicamente a un antígeno.”

25 El término “derivados de anticuerpo humano” se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

30 El término “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, han sido injertadas sobre secuencias estructurales humanas. Pueden efectuarse modificaciones adicionales de la región estructural dentro de las secuencias estructurales humanas.

35 El término “anticuerpo quimérico” se refiere a anticuerpos en los cuales las secuencias de región variable derivan de una especie y las secuencias de región constante derivan de otras especies, tal como en un anticuerpo en el cual las secuencias de región variable derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante derivan de un anticuerpo humano.

40 El término “anticuerpo mimético” se refiere a moléculas capaces de imitar la capacidad de un anticuerpo para adherirse a un antígeno, pero no están limitadas a estructuras de anticuerpos nativos. Ejemplos de dichos miméticos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a Affibodies, DARPinS, ANTICALINAS, Avímeros, y Versabodies, todos los cuales se describirán a continuación.

45 El término “molécula asociada” se refiere a la entidad que está conjugada con un anticuerpo en un conjugado de anticuerpo–molécula asociada. Ejemplos de moléculas asociadas, incluyen fármacos, toxinas, moléculas marcadoras, proteínas, y agentes terapéuticos.

50 Tal como se usa aquí, un anticuerpo que “se adhiere específicamente a mesotelina humana” tiene el significado de un anticuerpo que se adhiere a mesotelina humana con una K_D de 1 x 10⁻⁷ M o menos, más preferiblemente 5 x 10⁻⁸ M o menos, más preferiblemente 3 x 10⁻⁸ M o menos, más preferiblemente 1 x 10⁻⁸ M o menos, aún más preferiblemente 5 x 10⁻⁹ M o menos.

55 El término “no se adhiere sustancialmente” a una proteína o células, tal como se usa aquí, significa que no se adhiere o que no se adhiere con alta afinidad a la proteína o células, es decir, que se adhiere a la proteína o células con una K_D de 1 x 10⁻⁶ M o más, más preferiblemente 1 x 10⁻⁵ M o más, más preferiblemente 1 x 10⁻⁴ M o más, más preferiblemente 1 x 10⁻³ M o más, aún más preferiblemente 1 x 10⁻² M o más,.

60 El término “K_{asoc}” o “K_a” se refiere a la tasa de asociación de una interacción de anticuerpo–antígeno particular, mientras que el término “K_{dis}” o “K_d,” tal como se usa aquí, se refiere a la tasa de disociación de una interacción de anticuerpo–antígeno particular. El término “K_D,” tal como se usa aquí, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la materia. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia plasmónica superficial, preferiblemente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

65

El término “alta afinidad” para un anticuerpo de IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferiblemente 5×10^{-8} M o menos, aún más preferiblemente 1×10^{-8} M o menos, aún más preferiblemente 5×10^{-9} M o menos y aún más preferiblemente 1×10^{-9} M o menos para un antígeno determinado. Sin embargo, adhesión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, adhesión de

5 “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene K_D de 10^{-6} M o menos, más preferiblemente 10^{-7} M o menos, y aún más preferiblemente 10^{-8} M o menos.

El término “sujeto” incluye cualquier ser humano o animal no humano. El término “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos,

10 caballos, cabras, pollos, anfibios, reptiles, etc.

El término “alquilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se especifique lo contrario, una cadena recta o ramificada, o un radical hidrocarbonado cíclico, o combinaciones de éstos, que puede estar totalmente saturado, mono- o poliinsaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes, que tienen el número

15 de átomos de carbono designado (es decir, C_1 – C_{10} significa uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero no están limitados a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil) metilo, ciclopropil-metilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o

20 más enlaces dobles o enlaces triples. Ejemplos de grupos alquilo insaturados, incluyen, pero no están limitados a vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los isómeros y homólogos superiores. El término “alquilo” a menos que se indique lo contrario, significa también e incluye aquellos derivados de alquilo definidos en forma más detallada a continuación, tales como “heteroalquilo”. Los grupos alquilo, que están limitados a grupos hidrocarbonados se denominan

25 “homoalquilo”.

El término “alquileo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, tal como se ejemplifica, pero no se limita a $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, e incluye adicionalmente aquellos grupos descritos a continuación como “heteroalquileo.” Típicamente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá desde 1 a 24

30 átomos de carbono, siendo preferidos en la presente invención aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un “alquilo inferior” o “alquileo inferior” es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono o menos.

El término “heteroalquilo” por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se especifique lo contrario, una cadena estable recta o ramificada, o un radical hidrocarbonado cíclico, o combinaciones de éste, que consiste en el número establecido de átomos de carbono y por lo menos un heteroátomo seleccionado entre O, N,

35 Si, y S, y donde los átomos de nitrógeno, carbono y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los heteroátomo(s) O, N, S, y Si puede colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la cual se une el grupo alquilo al resto de la molécula. Ejemplos incluyen, pero no están limitados a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CHOCH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{NOCH}_3$, y $-\text{CH}=\text{CHN}(\text{CH}_3)_2$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tal como por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{NHOCH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$. De manera similar, el término “heteroalquileo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, tal como se ejemplifica, pero no está limitado a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2-$. Para grupos heteroalquileo, los heteroátomos pueden también

45 ocupar cualquiera o ambas terminales de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Los términos “heteroalquilo” y “heteroalquileo” abarcan poli (etilenglicol) y sus derivados (ver, por ejemplo, Shearwater Polymers Catalog, 2001). Además, para los grupos ligadores alquileo y heteroalquileo, ninguna orientación del grupo ligador está implicada por la dirección en la cual está escrita la fórmula del grupo ligador. Por ejemplo, la fórmula $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ representa tanto a $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ como a $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$.

50

El término “inferior” en combinación con los términos “alquilo” o “heteroalquilo” se refiere a un resto que tiene desde 1 a 6 átomos de carbono.

Los términos “alcoxi,” “alquilamino,” “alquilsulfonilo,” y “alquilitio” (o tioalcoxi) se usan en sentido convencional y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al remanente de la molécula a través del átomo de oxígeno, un grupo

55 amino, un grupo SO_2 o un átomo de azufre, respectivamente. El término “arilo sulfonilo” se refiere a un grupo arilo unido al remanente de la molécula a través de un grupo SO_2 y el término “sulfhidrilo” se refiere a un grupo SH.

En general, un “sustituyente acilo”, está también seleccionado del grupo establecido anteriormente. Tal como se usa aquí, el término “sustituyente acilo” se refiere a un grupo que se adhiere a, y que complementa la valencia de un

60 átomo de carbonilo que está directa o indirectamente adherido al núcleo policíclico de los compuestos de la presente invención.

Los términos “cicloalquilo” y “heterocicloalquilo” por sí mismos o en combinación con otros términos, representan a menos que se especifique lo contrario, versiones cíclicas de “alquilo” sustituido o no sustituido y “heteroalquilo”

65 sustituido o no sustituido, respectivamente. Adicionalmente, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la cual el heterociclo está adherido al remanente de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero

no están limitados a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no están limitados a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahydrothien-2-ilo, tetrahydrothien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares. Los heteroátomos y átomos de carbono de las estructuras cíclicas están opcionalmente oxidados.

Los términos "halo" o "halógeno," por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se especifique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo, o yodo. Adicionalmente, los términos tales como "haloalquilo," incluyen monohaloalquilo y polialquilo. Por ejemplo, el término "halo alquilo C₁-C₄", incluye, pero no está limitado a trifluorometilo, 2,2,2-trifluoretilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares.

El término "arilo" significa, a menos que se especifique lo contrario, un sustituyente hidrocarbonado, aromático, saturado, sustituido o no sustituido, que puede ser de anillo simple o anillos múltiples (preferiblemente desde 1 a 3 anillos) que están fusionados conjuntamente o ligados covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo, que contienen desde uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O, y S, donde los átomos de nitrógeno, carbono y azufre están opcionalmente oxidados, y los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar adherido al remanente de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no limitativos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-benzimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, y 6-quinolilo. Sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo mencionados anteriormente están seleccionados del grupo de sustituyentes descritos a continuación. "Arilo" y "heteroarilo" comprende también sistemas de anillos en los cuales uno o más, de los sistemas de anillos no aromáticos, están fusionados, o unidos de otra manera, a un sistema arilo o heteroarilo.

Abreviando, el término "arilo" cuando está fusionado en combinación con otros términos, (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye ambos anillos arilo y heteroarilo tal como se definieron anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo", incluye aquellos radicales en los cuales el grupo arilo está adherido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) que incluye aquellos aquellos grupos alquilo en los cuales un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) ha sido reemplazado mediante, por ejemplo, un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo," "heteroalquilo," "arilo" y "heteroarilo") incluye ambas formas sustituida o no sustituida del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proveen a continuación.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (que incluyen aquellos grupos a los cuales nos referimos a menudo como alquilenilo, alqueno, heteroalquilenilo, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno) se denominan generalmente "sustituyentes alquilo" y "sustituyentes heteroalquilo" respectivamente y pueden ser uno o más, de varios grupos seleccionados de, pero no limitados a: -OR', =O, =NR', =NOR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(=O)R', -C(=O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(=O)NR'R'', -NR'C(=O)R', -NR'C(=O)NR'R'', -NR'C(=O)₂R', -NRC(NR'R''R''')=NR''', -NRC(NR'R'')=NR'', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que está en el rango de cero a (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. Cada uno de R', R'', R''' y R'''' se refiere preferiblemente, independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R está independientemente seleccionado, así como también lo están los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' están adheridos al mismo átomo de nitrógeno, estos pueden estar combinados con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' incluye, pero no está limitado a 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. De la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la materia comprenderá que el término "alquilo", incluye grupos que incluyen átomos de carbono unidos a otros grupos distintos de hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (e.g., -C(=O)CH₃, -C(=O)CF₃, -C(=O)CH₂OCH₃, y similares).

De manera similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes arilo y los sustituyentes heteroarilo, están generalmente mencionados como "sustituyentes arilo" y "sustituyentes heteroarilo" respectivamente y pueden variar y están seleccionados de por ejemplo, halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halogen, -SiR'R''R''', -OC(=O)R', -C(=O)R', -CO₂R', -C(=O)NR'R'', -OC(=O)NR'R'', -NR'C(=O)R', -NR'C(=O)NR'R'', -NR'CO₂R', -NRC(NR'R'')=NR'', -S(=O)R', -S(=O)₂R', -S(=O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(F)₂, fluor alcoxi C₁-C₄, y fluor alquilo C₁-C₄, en un número que va en el rango de cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático y donde R', R'', R''' y R'''' están preferiblemente independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilo C₁-C₈ y heteroalquilo, arilo no sustituido y heteroarilo, (arilo no sustituido)-alquilo C₁-C₄, y (arilo no sustituido)oxi-alquilo C₁-C₄. Cuando un compuesto de la invención incluye

más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R está independientemente seleccionado, así como lo están también cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos.

5 Dos de los sustituyentes arilo en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden ser opcionalmente reemplazados con un sustituyente de la fórmula $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$, en la cual T y U son independientemente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace único, y q es un número entero de 0 a 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden ser opcionalmente reemplazados con un sustituyente de la fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, en la cual A y B son independientemente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace único, y r es un número entero de desde 1 a 4. Uno de los enlaces únicos del nuevo anillo así
10 formado puede ser reemplazado opcionalmente con un enlace doble. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden ser opcionalmente reemplazados con un sustituyente de la fórmula $-(CRR')_sX(CR''R''')_d-$, en la cual s y d son independientemente números enteros de desde 0 a 3, y X es $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(=O)-$, $-S(=O)_2-$, o $-S(=O)_2NR'-$. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' están preferiblemente seleccionados independientemente entre hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.

15 Tal como se usa aquí, el término "difosfato" incluye pero no está limitado a un éster de ácido fosfórico que contienen dos grupos fosfato. El término "trifosfato" incluye pero no está limitado a un éster de ácido fosfórico que contiene tres grupos fosfato.

20 Tal como se usa aquí el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

El símbolo "R" es una abreviatura general que representa un grupo sustituyente que está seleccionado de los grupos alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido, a menos que el contexto indique lo contrario.

25 Varios aspectos de la invención se describirán en forma más detallada en las sub-secciones siguientes.

Anticuerpos Anti-Mesotelina que Tienen Propiedades Funcionales Particulares

30 Los anticuerpos de esta descripción se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares. Por ejemplo, se unen específicamente a mesotelina humana, tal como mesotelina expresada en la superficie de células. Preferiblemente, un anticuerpo de esta descripción se une a mesotelina humana con alta afinidad, por ejemplo, con un K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferiblemente con un K_D de 5×10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente con un K_D de 1×10^{-8} M o menos. Un anticuerpo anti-mesotelina de esta descripción se une a mesotelina humana y
35 exhibe preferiblemente una o más de las propiedades siguientes:

- (a) se une a mesotelina humana con un K_D de 1×10^{-8} M o menos;
- (b) se internaliza mediante células que expresan mesotelina;
- (c) inhibe la adhesión de mesotelina al antígeno CA125 de cáncer de ovario;
- 40 (d) exhibe citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células que expresan mesotelina; y
- (e) inhibe el desarrollo de células que expresan mesotelina *in vivo* cuando se conjuga con una citotoxina.

Preferiblemente, un anticuerpo de esta descripción se une a una proteína de mesotelina con un K_D de 5×10^{-8} M o menos, se adhiere a una proteína de mesotelina con un K_D de 3×10^{-8} M o menos, se adhiere a una proteína mesotelina con un K_D de 1×10^{-8} M o menos, se adhiere a una proteína mesotelina con un K_D de 7×10^{-9} M o menos, se adhiere a una proteína mesotelina con un K_D de 6×10^{-9} M o menos o se adhiere a una proteína de mesotelina con un K_D de 5×10^{-9} M o menos. La afinidad de unión del anticuerpo para mesotelina, puede evaluarse por ejemplo, mediante análisis BIACORE standard (ver por ejemplo, Ejemplo 3B).

50 Anticuerpos preferidos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Adicionalmente o alternativamente los anticuerpos pueden ser por ejemplo, anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados.

Anticuerpos Monoclonales 3C10, 6A4 y 7B1

55 Los anticuerpos preferidos de esta descripción son los anticuerpos monoclonales humanos 3C10, 6A4 y 7B1, aislados y estructuralmente caracterizados como se describió en los Ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácido V_H de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs: 19, 20 y 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácido V_L de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente.

60 En otro aspecto, esta descripción provee anticuerpos que comprenden las CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena ligera de 3C10, 6A4 o 7B1, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácido de las V_H CDR1s de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en SEC ID NOs: 1-3, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las V_H CDR2s de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs: 4-6, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de V_H CDR3s de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs: 7-9, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de V_L CDR1s de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs: 10-12, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de V_L CDR2s de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs:
65

13–15. Las secuencias de aminoácido de V_L CDR3s de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs: 16–18, respectivamente. Las regiones CDR se delinearon usando el sistema (Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91–3242, denominada a continuación “Kabat ‘242”).

5 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede adherirse a mesotelina humana, y que la especificidad de adhesión al antígeno es provista principalmente por las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias V_H CDR1, CDR2, y CDR3 y secuencias V_L CDR1, CDR2, y CDR3 pueden “mezclarse y emparejarse” (es decir, las CDRs de anticuerpos diferentes pueden mezclarse y emparejarse, aunque cada anticuerpo debe contener una V_H CDR1, CDR2, y CDR3 y una V_L CDR1, CDR2, y CDR3) para crear otras moléculas de adhesión anti-mesotelina de esta descripción. Preferiblemente, cuando secuencias V_H CDR son mezcladas y emparejadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H particular es reemplazada con secuencias CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias V_L CDR son mezcladas y emparejadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_L particular es reemplazada preferiblemente con secuencias CDR estructuralmente similares. Resultará fácilmente aparente para el experto que tiene experiencia en la materia que pueden crearse nuevas secuencias V_H y V_L sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR descritas aquí para anticuerpos monoclonales 3C10, 6A4 y 7B1.

20 Por consiguiente, en otro aspecto esta descripción provee un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 1–3;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 4–6;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 7–9;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 10–12;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 13–15; and
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 16–18;

35 donde el anticuerpo se adhiere específicamente a mesotelina humana

Es bien conocido en la materia que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, solo, puede determinar la especificidad de adhesión de un anticuerpo para un antígeno relacionado, y que pueden generarse predeciblemente anticuerpos múltiples que tienen la misma especificidad de adhesión basada en una secuencia CDR3 común.

45 Por consiguiente, la presente descripción provee anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo, derivados de un animal humano o no humano, donde el anticuerpo monoclonal es capaz de adherirse específicamente a mesotelina humana. Dentro de ciertos aspectos, la presente descripción provee anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o rata, donde el anticuerpo monoclonal es capaz de adherirse específicamente a mesotelina. Dentro de ciertas realizaciones, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir para la adhesión con; (b) retienen las características funcionales de; (c) se adhieren al mismo epítipo que; y/o (d) tienen una afinidad de adhesión similar a la que corresponde al anticuerpo no humano parental.

55 Dentro de otros aspectos, la presente descripción provee anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo humano, tal como por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano donde el anticuerpo humano es capaz de adherirse específicamente a mesotelina humana. Dentro de otros aspectos la presente descripción provee anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios de cadena pesada y/o cadena ligera de un primer anticuerpo humano tal como por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano donde el primer anticuerpo humano es capaz de adherirse específicamente a mesotelina humana y donde el dominio CDR3 del primer anticuerpo humano reemplaza un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de adhesión para mesotelina para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de adherirse específicamente a mesotelina humana. Dentro de algunas realizaciones, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o cadena ligera del primer anticuerpo humano (a) son capaces de competir para la adhesión con; (b) retienen las características funcionales; (c) se adhieren al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de adhesión similar a la que corresponde al primer anticuerpo humano parental.

Anticuerpos que Tienen Secuencias de Línea Germinal Particular

En ciertas realizaciones un anticuerpo de esta descripción comprende una V_H de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una V_L de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular.

Por ejemplo, en una realización preferida, esta descripción provee un anticuerpo monoclonal aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una V_H que es el producto de o que deriva de un gen humano V_H 3–33 o de un gen humano V_H 3–7, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a mesotelina humana. En otra realización preferida, esta descripción provee un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno de éste, que comprende una V_L que es el producto que deriva de un gen humano V_K L6 de un gen humano V_K A27, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a mesotelina humana. En otra realización preferida, esta descripción provee un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno de éste, donde el anticuerpo comprende una V_H que es el producto de o que deriva de un gen humano V_H 3–33 y comprende una V_L que es el producto de o que deriva de un gen humano V_K L6, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a mesotelina humana. En otra realización preferida esta descripción provee un anticuerpo monoclonal aislado, o una parte de unión a antígeno, donde el anticuerpo comprende una V_H que es el producto de o que deriva de un gen humano V_H 3–7 y que comprende una V_L que es el producto de o que deriva de un gen humano de V_K A27 donde el anticuerpo se adhiere específicamente a mesotelina humana.

Dichos anticuerpos pueden poseer una o más de las características funcionales descritas en forma detallada anteriormente tal como alta afinidad de adhesión a mesotelina humana, internalización mediante células que expresan mesotelina, inhibición de adhesión de mesotelina CA125, la capacidad de intermediar ADCC contra células que expresan mesotelina y/o la capacidad de inhibir el crecimiento de tumores de células tumorales que expresan mesotelina *in vivo* cuando se conjugan con citotoxina.

Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_L de V_H 3–33 y V_K L6, respectivamente, son los anticuerpos 3C10 y 6A4. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 3–7 y V_K A27, respectivamente, es el anticuerpo 7B1.

Tal como se usa aquí, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que son el “producto de” o que “derivan de” una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Dichos sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que es portador de genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o rastrear una genoteca de inmunoglobulina humana exhibida en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es “el producto de” o que “deriva de” una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal, comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácido de las inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que es más próxima en secuencia (que tiene el % de identidad más elevado) con la secuencia de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es “el producto de” o que “deriva de” una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con las secuencias de línea germinal debido a, por ejemplo, las mutaciones somáticas que ocurren en forma natural o por introducción intencional de mutación dirigida a un sitio. Sin embargo un anticuerpo humano seleccionado, es típicamente por lo menos 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contienen residuos aminoácidos que identifican que el anticuerpo humano es humano cuando se compara con las secuencias de aminoácido de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser por lo menos 95 % o incluso por lo menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en secuencias de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular exhibirá no más de 10 diferencias de aminoácido de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede exhibir no más de 5 o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

En una realización más, un anticuerpo de esta descripción comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácido que son homólogas para las secuencias de aminoácido de los anticuerpos preferidos que se describen aquí, y donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-mesotelina de esta descripción.

Por ejemplo, esta descripción provee un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno de éste, que comprende una V_H y una V_L, donde: (a) la V_H comprendo una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 19–21; (b) la V_L comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80 % homóloga con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 22–24; y (c) el anticuerpo se adhiere específicamente a

mesotelina humana.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácido V_H y/o V_L pueden ser 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homólogas con las secuencias indicada anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen alta homología (es decir, 80 % o más) con las regiones V_H y V_L de las secuencias que se indicaron anteriormente puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, por mutagénesis intermediada por PCR) o dirigida al sitio) de moléculas de ácido nucleico que codifican las SEC ID NOs: 25–27 o 28–30, seguido de ensayos del anticuerpo alterado codificado para determinar la función retenida (es decir, las funciones establecidas anteriormente) usando los ensayos funcionales que se describen aquí.

El porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácido es equivalente a la identidad porcentual entre las dos secuencias. La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de homología = # de posiciones idénticas /total # de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha que necesita ser introducidas para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias, puede lograrse usando un algoritmo matemático tal como se describe en los ejemplos no limitativos siguientes.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11–17 (1988)) que ha sido incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuo en peso PAM120, un error de longitud de brecha de 12 y un error de brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444–453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando o bien la matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

Las secuencias de proteínas de la presente descripción pueden usarse también como “secuencia de interrogación” para buscar en bases de datos públicas por ejemplo, la identificación de las secuencias relacionadas. Dichas investigaciones pueden llevarse a cabo usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403–10. Las investigaciones de proteína BLAST puede llevarse a cabo con el programa XBLAST, resultado = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácido homólogas a las moléculas de anticuerpos de esta descripción para obtener alineaciones incompletas con propósitos comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389–3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros de error de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) son útiles. Ver www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de esta descripción comprende una V_H que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una V_L que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, donde una o más de estas secuencias CDR comprende secuencias de aminoácido especificadas basadas en anticuerpos de anti-mesotelina conocidos, o modificaciones conservadoras de éstos, y donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-mesotelina de esta descripción. Se entiende en la materia que pueden efectuarse ciertas modificaciones de secuencias conservadoras, que no remueven la adhesión del antígeno. Por consiguiente, esta descripción provee un anticuerpo monoclonal o una parte de unión a antígeno, que comprende una V_H que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una V_L que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, donde: (a) la secuencia CDR3 de V_H comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 7–9, y una modificación conservadora de las mismas; (b) las secuencias CDR3 de V_L comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 16–18, y modificaciones conservadoras de las mismas; y (c) el anticuerpo se adhiere específicamente a mesotelina humana.

En una realización preferida, la secuencia CDR2 de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácido de la SEC ID NOs: 4–6, y modificaciones conservadoras de las mismas; y una secuencia CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 13–15, y modificaciones conservadoras de las mismas. En otra realización preferida, las secuencias CDR1 de región variable de cadena pesada comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 1–3, y modificaciones conservadoras de éstas; y una secuencia CDR1 de región variable de cadena ligera, que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 10–12, y modificaciones conservadoras de las mismas.

El término “modificaciones de secuencia conservadora” se refiere a modificaciones de aminoácido que no afectan o alteran significativamente las características de adhesión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácido.

Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones, y deleciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo mediante técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis intermediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las cuales el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena secundaria similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias similares han sido definidas en la materia. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas secundarias básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas secundarias ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas secundarias polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadenas secundarias no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas secundarias beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas secundarias aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Por lo tanto, uno o más de los residuos aminoácidos dentro de las regiones CDR del anticuerpo de esta descripción pueden ser reemplazados con otros residuos de aminoácido de la misma familia de cadena secundaria, y el anticuerpo alterado puede ser sometido a ensayo para determinar la función retenida, usando los ensayos funcionales que se describen aquí.

Anticuerpos que se adhieren al mismo epítipo como anticuerpos anti-mesotelina

En otra realización, esta descripción provee anticuerpos que se unen a un epítipo o mesotelina reconocidos por cualquiera de los anticuerpos monoclonales de anti-mesotelina (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de competir en forma cruzada para la adhesión a mesotelina humana con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de esta descripción). En realizaciones preferidas, el anticuerpo de referencia para los estudios de competición cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 3C10 (que tiene las secuencias V_H y V_L que se muestran en las SEC ID NOs: 19 y 22, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal 6A4 (que tiene las secuencias V_H y V_L que se muestran en las SEC ID NOs: 20 y 23, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal 7B1 (que tiene las secuencias V_H y V_L que se muestran en las SEC ID NOs: 21 y 24, respectivamente).

Dichos anticuerpos de competición cruzada pueden ser identificados basándose en su capacidad para competir en forma cruzada con 3C10, 6A4 o 7B1 en ensayos de adhesión de mesotelina standard tales como análisis ELISA o BIAcore. En una realización preferida, el anticuerpo que se adhiere al mismo epítipo en mesotelina humana, tal como es reconocido por 3C10, 6A4 o 7B1 es un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse tal como se describe en los ejemplos.

Anaticuerpos modificados y manipulados genéticamente

Un anticuerpo de la invención puede prepararse además usando un anticuerpo que tiene una o más secuencias conocidas de V_H y/o V_L de anticuerpo anti-mesotelina como material de partida para la manipulación de un anticuerpo modificado que tiene propiedades alteradas en comparación con el anticuerpo de partida. Pueden modificarse uno o más aminoácidos dentro de una o ambas V_H y V_L , dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones estructurales. Adicionalmente o alternativamente, los residuos dentro de las regiones constantes pueden modificarse para alterar las funciones efectoras del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, el injerto de CDR puede usarse para manipular regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos aminoácido en sus CDRs. Por esta razón, las secuencias de aminoácido dentro de las CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayor parte de las interacciones de anticuerpo-antígeno, es posible que expresen anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos naturales, mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertadas sobre secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Ver. USA.* 86:10029-10033; Patente Norteamericana No. 5,225,539 de Winter, y Patentes Norteamericanas 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen *et al.*)

Por consiguiente, otra realización de esta descripción pertenece a un anticuerpo monoclonal aislado o a una parte de unión a antígeno de éste, que comprende una V_H que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 1-3, SEC ID NOs: 4-6, y SEC ID NOs: 7-9, respectivamente, y una V_L que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 10-12, SEC ID NOs: 13-15, y SEC ID NOs: 16-18, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias V_H y V_L de CDR de anticuerpos monoclonales 3C10, 6A4 o 7B1 y sin embargo pueden contener secuencias estructurales diferentes de estos anticuerpos.

Dichas secuencias estructurales pueden obtenerse de las bases de datos públicas de ADN o de las referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes V_H y V_L humanos pueden encontrarse en la base de datos de línea germinal humana "VBase" disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase, así como también en Kabat '242; Tomlinson, I.

M., *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* **227**:776–798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**:827–836; cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia. Como un ejemplo más, las secuencias de ADN de línea germinal para los genes V_H y V_L humanos pueden encontrarse en las bases de datos de Genbank. Por ejemplo, las secuencias de línea germinal de cadena pesada siguientes que se encuentran en el HCo7 HuMAb de ratón están disponibles en los números de acceso a Genbank que se acompañan: 1–69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3–33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3–7 (NG_0010109 y NT_024637). Como otro ejemplo, las secuencias de línea germinal de cadena pesada siguientes que se encuentran en el HCo12 de ratón del tipo de ratón HuMAb se encuentran disponibles en los Números de Acceso de Genbank que se acompañan: 1–69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 5–51 (G_0010109 y NT_024637), 4–34 (G_0010109 y NT_024637), 3–30.3 (CAJ556644) y (AJ406678). Todavía hay otra fuente de secuencias de línea germinal de cadena pesada y ligera humana que es la base de datos de genes de inmunoglobulina humana disponibles en IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Las secuencias de proteína de anticuerpos se comparan contra una base de datos de secuencias de proteína compiladas usando uno de los métodos de investigación de similitud de secuencias denominado Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* **25**:3389–3402), que es bien conocido por los expertos en la materia. BLAST es un algoritmo heurístico porque una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia de anticuerpos y la secuencia de bases de datos contendrá probablemente pares de segmentos de alto resultado (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyos resultados no pueden ser mejorados por extensión o recorte se denominan un *hit*. Resumiendo, las secuencias nucleotídicas de origen VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.fp>) son traducidas, y la región entre e incluyendo, la región de estructura FR1 hasta FR3 es retenida. Las secuencias de bases de datos tienen una longitud promedio de 98 residuos. Las secuencias duplicadas que son emparejamientos exactos a través de la longitud entera de la proteína son removidas. Una búsqueda BLAST para proteínas usando los parámetros standard, del programa blastp con error, excepto el filtro de baja complejidad, el cual es cerrado, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra para obtener los 5 *hits* principales que proveen los emparejamientos de secuencia. Las secuencias nucleotídicas son traducidas en todos los seis marcos y el marco sin codones de stop en el segmento de emparejamiento de la secuencia de base de datos se considera el *hit* potencial. Esto se confirma a su vez usando el programa BLAST, tblastx, el cual traduce la secuencia de anticuerpos en todos los seis marcos y compara aquellas traducciones con las secuencias nucleotídicas VBASE dinámicamente traducidas en todos los seis marcos. Otras bases de datos de secuencia de línea germinal humana, tal como las disponibles en IMGT (<http://imgt.cines.fr>), pueden investigarse de manera similar para VBASE tal como se describió anteriormente.

Las identidades son emparejamientos de aminoácido exactos, entre la secuencia de anticuerpo y la base de datos de proteína en la longitud entera de la secuencia. Los positivos (identidades + emparejamiento de sustitución) no son idénticos, sino que son sustituciones de aminoácido guiadas por la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia de anticuerpo empareja dos de las secuencias de base de datos con la misma identidad, se decidiría que el *hit* con más positivos sería el *hit* de secuencia de emparejamiento.

Las secuencias estructurales preferidas para ser usadas en los anticuerpos de esta descripción, son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias estructurales usadas por los anticuerpos seleccionados de esta descripción, por ejemplo, similares a las secuencias estructurales V_H 3–33 (SEC ID NO: 31) o V_H 3–7 (SEC ID NO: 32) y/o las secuencias estructurales V_K L6 (SEC ID NO: 33) o V_K A27 (SEC ID NO: 34). Las secuencias V_H CDR1, CDR2, y CDR3 y las secuencias V_K CDR1, CDR2, y CDR3 pueden estar injertadas sobre regiones estructurales que tienen la secuencia idéntica a la que se halló en el gen de inmunoglobulina de línea germinal del cual deriva la secuencia estructural, o la secuencias de CDR pueden ser injertadas sobre las regiones estructurales que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha hallado que en ciertos casos, es beneficioso mutar residuos dentro de las regiones estructurales para mantener o realzar la capacidad de adhesión al antígeno (ver por ejemplo, las Patentes Norteamericanas 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

Otro tipo de modificación de región variable es la mutación de los residuos aminoácido dentro de las regiones V_H y/o V_K CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar una o más propiedades de adhesión (por ejemplo, la afinidad). La mutagénesis dirigida al sitio o mutagenesis intermediada por PCR, puede llevarse a cabo para introducir las mutaciones y el efecto sobre la adhesión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede ser evaluada en ensayos *in vitro* o *in vivo* tal como se describen aquí. Preferiblemente se introducen modificaciones conservadoras. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácido, pero preferiblemente, son sustituciones. Además, típicamente, no se alteran más de una, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

Por consiguiente en otra realización, la presente descripción provee anticuerpos monoclonales anti-mesotelina aislados, o porciones de adhesión de antígeno de los mismos, que comprenden: (a) una región V_H CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 1–3, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID NOs: 1–3; (b) una región CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 4–6, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido en comparación con las

SEC ID NOs: 4–6; (c) una región CDR3 de V_H CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 7–9, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 7–9; (d) una región CDR1 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 10–12, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 10–12; (e) una región CDR2 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 13–15, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 13–15; y (f) una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NOs: 16–18, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 16–18.

Los anticuerpos manipulados de la invención incluyen aquellos en los cuales se han efectuado modificaciones en los residuos estructurales dentro de V_H y/o V_L, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones estructurales se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Una realización es la de “retromudar” uno o más residuos estructurales a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente un anticuerpo que ha sido sometido a mutación somática, puede contener residuos estructurales que difieren de la secuencia de línea germinal de la cual deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden ser identificados comparando las secuencias estructurales del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las cuales deriva el anticuerpo.

Por ejemplo, la Tabla a muestra regiones en las cuales una posición de aminoácido de la región estructural (usando el sistema de numeración Kabat) difiere de la línea germinal y de la manera en la que puede retromutarse esta posición a la línea germinal mediante las sustituciones indicadas:

Tabla A – Ejemplos de retromutaciones		
Región	Posición del Amino Acido de la Estructura	Retromutación
3C10 V _H	3	Y3Q
3C10 V _H	27	I27F
3C10 V _H	82	L82Q
6A4 V _H	3	H3Q
6A4 V _H	23	V23A
6A4 V _H	27	I27F
6A4 V _H	30	R30S
6A4 V _H	93	I93V
7B1 V _H	3	H3Q
7B1 V _H	41	Q41P
7B1 V _H	80	S80Y

Otro tipo de modificación de estructura involucra mutar uno o más residuos dentro de la región estructural o incluso dentro de una o más regiones CDR para remover los epítomos de célula T para reducir de esta manera, la potencial inmunogenicidad del anticuerpo. Esta realización se denomina también “desinmunización” y se describe en forma más detallada en la Patente Norteamericana 2003/0153043 de Carr *et al.*

Además, o en forma alternativa a modificaciones efectuadas dentro de la estructura o regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser manipulados para incluir modificaciones dentro de las regiones Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales, tales como el período de vida media del suero, la fijación de complemento, la adhesión al receptor Fc, y/o la citotoxicidad dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más porciones químicas pueden ser agregadas al anticuerpo), o puede modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales. Cada una de estas realizaciones se describe en forma más detallada a continuación. La numeración de los residuos en las regiones Fc es la de Índice EU de Kabat.

En una realización, la región de bisagra de CH1 es modificada de manera de alterar (es decir, aumentar o disminuir) la cantidad de residuos cisteína en la región de bisagra, tal como se describió en la Patente Norteamericana 5.677.425 de Bodmer *et al.* Dicha alteración puede facilitar el ensamblado de las cadenas ligeras y pesadas o aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir el período de vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácido en la región de interfase del dominio CH2–CH3 del fragmento de Fc–bisagra, de modo que el anticuerpo tiene adhesión deteriorada a la proteína A estafilococcílica (SpA) con relación a la adhesión a SpA del dominio Fc–bisagra nativo, tal como se describió en la Patente Norteamericana 6.165.745 de Ward *et al.*

En otra realización, el anticuerpo es modificado para aumentar su vida media biológica. Por ejemplo, pueden

introducirse una o más de las mutaciones siguientes: T252L, T254S, T256F, tal como se describió en la Patente Norteamericana 6,277.375 de Ward. Alternativamente, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL, para contener un epítipo de adhesión al receptor de recuperación, tomado desde dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describió en las Patentes Norteamericanas 5.869.046 y 6.121.022 de Presta *et al.*

En otra realización más, la región Fc es alterada mediante el reemplazo de por lo menos un residuo aminoácido con residuos aminoácido diferentes para alterar sus funciones efectoras. Por ejemplo, uno o más de los residuos aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden ser reemplazados con un residuo aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada para un ligando efector – por ejemplo, un receptor Fc o el componente de complemento C1 – pero retiene la capacidad de adhesión al antígeno del anticuerpo principal, tal como se describió en las Patentes Norteamericanas 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter *et al.*

En otro ejemplo, uno o más residuos aminoácido 329, 331 y 322 pueden ser reemplazados de modo que el anticuerpo tenga una adhesión C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida o anulada, tal como se describió en la Patente Norteamericana 6.194.551 de Idusogie *et al.*

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácido dentro de las posiciones del aminoácido 231 y 239 están alteradas para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Esta realización se describió adicionalmente en la WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

En otro ejemplo, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para intermediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcγ mediante la modificación de uno o más aminoácidos en las posiciones siguientes: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta realización se describió adicionalmente en WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de adición a IgG1 for FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn humano fueron mapeadas y las variantes con adhesión mejorada han sido descritas (ver Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591–6604). Se demuestra que mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoraron la adhesión a FcγRIII. Adicionalmente se demuestra que los mutantes de combinación siguientes mejoran la adhesión FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En otra realización más, el extremo C-terminal de un anticuerpo de la presente invención es modificado mediante la introducción de un residuo cisteína tal como se describió en PCT/US2008/073569, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Dichas modificaciones incluyen, pero no están limitadas al reemplazo de un residuo aminoácido existente en o cerca del C-terminal de una secuencia de cadena pesada de longitud completa, así como también la introducción de una extensión que contiene cisteína al C-terminal de una secuencia de cadena pesada de longitud total. En realizaciones preferidas, la extensión que contiene cisteína comprende la secuencia cisteína-alanina-alanina (de N-terminal a C-terminal).

En realizaciones preferidas, la presencia de dichas modificaciones de cisteína C-terminal proveen una ubicación para la conjugación de una molécula asociada, tal como un agente terapéutico o una molécula marcadora. En particular, la presencia de un grupo tiol reactivo, debido a la modificación de cisteína C-terminal, puede usarse para conjugar una molécula asociada empleando los ligadores disulfuro o un grupo maleimida reactivo al sulfhidrilo. La conjugación del anticuerpo con una molécula asociada permite de esta manera aumentar el control sobre el sitio de adhesión específico. Además, mediante la introducción del sitio de adhesión en o cerca del C-terminal, la conjugación puede ser optimizada de modo de reducir o eliminar la interferencia con las propiedades funcionales del anticuerpo, permitiendo un análisis simplificado y control de calidad de las preparaciones del conjugado.

En una realización más, la glicosilación de un anticuerpo es modificada por eliminación de glicosilación (aglicosilación) o alterando los sitios de glicosilación, para aumentar su afinidad para su antígeno. Por ejemplo, pueden efectuarse una o más sustituciones de aminoácido que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación estructurales de región variable. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Ver patentes Norteamericanas 5.714.350 y 6.350.861 de Co *et al.* Se describen realizaciones adicionales para alterar la glicosilación en la Patente Norteamericana 7.214.775 de Hanai *et al.*; Patente Norteamericana 6.737.056 de Presta; Patente Norteamericana 20070020260 de Presta; WO 2007/084926 de Dickey *et al.*; WO 2006/089294 de Zhu *et al.*; y WO 2007/055916 de Ravetch *et al.*; cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Adicionalmente o alternativamente, puede prepararse un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNac bisectantes incrementadas. Dichos patrones de glicosilación alterados han demostrado que aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidrato pueden lograrse por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas de células Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen fucosil transferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa),

de manera que los anticuerpos expresados en estas líneas de células carecen de fucosa en sus carbohidratos. Ver Patente Norteamericana 2004/0110704 de Yamane *et al.* y Yamane–Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614–22. Como un ejemplo más, la Patente Europea 1.176.195 Hanai *et al.* describe una línea de células con un gen FUT8 funcionalmente disgregado, que codifica una glucosil transferasa de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea de célula exhiben hipofucosilación. Hanai *et al.* describe también líneas de células que tienen una baja actividad enzimática para agregar fucosa a la N–acetil glucosamina que se adhiere a la región Fc del anticuerpo. WO 03/035835 de Presta describe una variante de línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para agregar fucosa a carbohidratos ligados a Asn(297), lo cual da como resultado hipofucosilación (ver también Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733–26740). La WO 99/54342 de Umana *et al.* describe líneas de células manipuladas para expresar transferasas de glicosilo modificadoras de glicoproteínas, de manera que los anticuerpos expresados por estas líneas de células exhiben un incremento de las estructuras GlcNac bisectantes y un aumento de la actividad de ADCC de los anticuerpos (ver también Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176–180). Alternativamente, los residuos fucosa del anticuerpo pueden ser disociados usando una enzima fucosidasa (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516–23).

Adicionalmente o alternativamente, puede prepararse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, donde esa alteración se refiere al nivel de sialiación del anticuerpo. Dichas alteraciones se describen en la 2007/084926 de Dickey *et al.*, y WO 2007/055916 de Ravetch *et al.*, ambas incorporadas aquí como referencia. Por ejemplo, puede emplearse una reacción enzimática con sialidasa, tal como se describió en la Patente Norteamericana 5.831.077, que se incorpora aquí como referencia. Otros ejemplos de enzimas apropiadas son neuraminidasa y N–Glicosidasa F, tal como se describió en Schloemer *et al.*, *J. Virology*, 15(4), 882–893 (1975) y en Leibiger *et al.*, *Biochem J.*, 338, 529–538 (1999), respectivamente. Alternativamente, pueden emplearse métodos para aumentar el nivel de sialiación empleando las enzimas sialil transferasa tal como se describieron en Basset *et al.*, *Scandinavian Journal de Immunology*, 51(3), 307–311 (2000).

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla aquí en la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado por ejemplo, para aumentar su vida media biológica (por ejemplo, el suero). Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo o un fragmento del mismo se hace reaccionar típicamente con un derivado polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado aldehído de PEG. O bien, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva, (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se usa aquí, el término “polietilenglicol” abarca cualquiera de las formas de PEG que han sido usadas para derivatizar otras proteínas tales como monoalcoxi (C1–C10)– o ariloxi–polietilén glicol o polietilén glicol– maleimida. El anticuerpo que debe ser pegilado puede ser un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la materia y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Ver por ejemplo, la patente Europea 0 154 316 de Nishimura *et al.* y EP 0 401 384 de Ishikawa *et al.*

Fragmentos de Anticuerpos y Miméticos de Anticuerpos

La presente invención no está limitada a anticuerpos tradicionales y puede llevarse a la práctica a través del uso de fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos. Se ha desarrollado ahora y es ampliamente conocida en la técnica una amplia variedad de tecnologías de fragmentos de anticuerpos y mimética de anticuerpos.

Los anticuerpos de dominio (dAbs) son las unidades de adhesión funcional más pequeñas de los anticuerpos, correspondiendo a las regiones variables de cualquiera de los anticuerpos humanos de cadena pesada (VH) o de cadena ligera (VL). Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de genotecas extensas y altamente funcionales de dAbs VH y VL completamente humanos (más de diez billones de secuencias diferentes en cada genoteca), y los usos de estas genotecas para seleccionar dAbs que sean específicos para dianas terapéuticas. En cambio con muchos anticuerpos convencionales, los Anticuerpos de Dominio están bien expresados en sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamíferos. Otros detalles de anticuerpos de dominio y métodos de producción de los mismos pueden obtenerse con referencia a las Patentes Norteamericanas 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; y 6.696.245; Patente Norteamericana 2004/0110941; EP 1433846. 0368684 y 0616640; WO 2005/035572. 2004/101790. 2004/081026. 2004/058821. 2004/003019 y 2003/002609, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Los Nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada naturales. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un dominio variable único (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Lo que es importante, es que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que tiene capacidad de adherirse al antígeno entero del anticuerpo de cadena pesada original. Los Nanocuerpos tienen una elevada homología con los dominios VH de los anticuerpos humanos y pueden ser adicionalmente humanizados sin ninguna pérdida de actividad. Lo que es importante, es que los Nanocuerpos tienen un bajo potencial inmunogénico, lo cual ha sido confirmado en estudios en primates con compuestos de plomo Nanocuerpos.

Los Nanocuerpos combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con importantes características de fármacos de moléculas pequeñas. Tal como los anticuerpos convencionales, los Nanocuerpos muestran una elevada especificidad para la diana y afinidad y baja toxicidad inherente. Sin embargo, igual que los fármacos de

moléculas pequeñas, pueden inhibir las enzimas y acceder rápidamente a hendiduras receptoras. Además, los Nanocuerpos son extremadamente estables, pueden ser administrados por medios distintos de inyección (ver por ejemplo, WO 2004/041867, incorporado aquí como referencia en su totalidad), y son fáciles de manufacturar. Otras ventajas de los Nanocuerpos incluyen el reconocimiento de epítomos no comunes u ocultos como resultado de su pequeño tamaño, adhiriéndose dentro de las cavidades o sitios activos de dianas proteínicas con alta afinidad y selectividad debido a su especial flexibilidad de formato de fármaco tridimensional, a la adaptación especial de vida media y a la facilidad y velocidad de descubrimiento de fármacos.

Los Nanocuerpos están modificados mediante genes únicos y son producidos eficientemente en casi todos los huéspedes procarióticos y eucarióticos, por ejemplo, *E. coli* (ver por ejemplo, Patente Norteamericana 6.765.087, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (ver por ejemplo, Patente Norteamericana 6.838.254, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad).

El método de Nanoclon (ver por ejemplo, la WO 06/079372, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad) genera Nanocuerpos contra una diana deseada, basándose en la selección automática de alto rendimiento de las células B y podría usarse en el contexto de la presente invención.

UniCuerpos, se refiere a otra tecnología de fragmentos de anticuerpos, basados sin embargo en la remoción de la región de bisagra de los anticuerpos IgG4. La delección de la región de bisagra da como resultado una molécula que tiene esencialmente la mitad del tamaño de un anticuerpo IgG4 tradicional y tiene una región de adhesión univalente en vez de la región de adhesión bivalente de un anticuerpo IgG4. Tal como con los anticuerpos IgG4, los UniCuerpos son inertes y no interactúan con el sistema inmunitario, lo cual es ventajoso para el tratamiento de enfermedades en las cuales no se desea una respuesta inmunitaria. Los UniCuerpos pueden funcionar para inhibir o silenciar, pero no matar las células a las cuales están unidos. Adicionalmente, la adhesión de UniCuerpos a células cancerosas no las estimula para proliferar. Además, debido a que los UniCuerpos son aproximadamente más pequeños, pueden mostrar mejor distribución en tumores sólidos más grandes con eficacia potencialmente ventajosa. Los UniCuerpos son despejados del cuerpo a un régimen similar al de los anticuerpos IgG4 enteros y son capaces de adherirse con afinidad similar a sus antígenos. Otros detalles de UniCuerpos pueden obtenerse con referencia a la WO 2007/059782, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Las moléculas de Afficuerpos son proteínas de afinidad basadas en un dominio de proteína de residuo de 58 aminoácidos derivado de un dominio de adhesión a IgG de un haz trihelicoidal de proteína A estafilocócica. Este dominio ha sido usado como andamiaje para la construcción de genotecas de fagémidos combinatorios de los cuales pueden seleccionarse variantes de Afficuerpos que hacen diana en las moléculas deseadas, usando tecnología de exhibición de fagos (Nord *et al.*, *Nat Biotechnol* 1997;15:772-7; Ronmark *et al.*, *Eur J Biochem* 2002;269:2647-55). La estructura simple, robusta, y el bajo peso molecular (6 kDa) de moléculas de Afficuerpos los convierten en apropiados para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección e inhibidores de interacciones del receptor. Otros detalles de Afficuerpos y su producción se encuentran en la Patente Norteamericana 5.831.012 que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los Afficuerpos rotulados pueden ser también útiles en aplicaciones de formación de imágenes para determinar la abundancia de isoformas.

DARPs (Proteínas de Repetición de Anquirina Diseñada) abarcan la tecnología mimética de anticuerpos DRP (Proteína de Repetición Diseñada) desarrollada para explotar las capacidades de adhesión de polipéptidos no-anticuerpos. Las proteínas de repetición tales como proteínas de repetición ricas en leucina y anquirina son moléculas de adhesión ubicuas que a diferencia de los anticuerpos, ocurren intra- y extracelularmente. Su especial arquitectura modular representa unidades estructurales repetitivas (repeticiones) que se apilan conjuntamente para formar dominios repetitivos alargados que exhiben superficies de adhesión a la diana variables y modulares. Basándose en esta modularidad, pueden generarse librerías combinatorias de polipéptidos con especificidades de adhesión altamente diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño de concenso de repeticiones auto-compatibles que exhiben residuos de superficie variable y su ensamblado aleatorio en dominios repetitivos.

Pueden producirse DARPs en sistemas de expresión bacteriana con rendimientos muy elevados y están entre las proteínas más estables que se conocen. Se han hecho DARPs de alta afinidad, sumamente específicos, que se adhieren a un alto rango de proteínas diana, incluyendo receptores humanos, citocinas, quinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana, incluyendo algunas que tienen afinidades en el rango de dígito único nanomolar a picomolar.

Se han usado DARPs en un amplio rango de aplicaciones incluyendo ELISA, ELISA sandwich, análisis citométrico de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicación de chips, purificación por afinidad o borrón Western. Los DARPs no solo son ideales para bloquear las interacciones de proteína a proteína, sino que inhiben también las enzimas. El muy rápido y específico enriquecimiento en el tumor y las muy favorables relaciones de tumor a sangre hacen que los DARPs sean muy apropiados para los diagnósticos *in vivo* o las realizaciones terapéuticas. Información adicional con respecto a DARPs y otras tecnologías de DRP pueden hallarse en la Patente Norteamericana 2004/0132028 y WO 02/20565, incorporándose ambas aquí como referencia.

Las Anticalinas son otra tecnología mimética de anticuerpos, sin embargo, en este caso, la especificidad de adhesión deriva de LIPOCALINAS, una familia de proteínas de bajo peso molecular que está natural y abundantemente expresada en tejidos humanos y fluidos corporales. Las Lipocalinas han evolucionado para llevar a cabo un rango de funciones *in vivo* asociadas al transporte fisiológico y al almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o

5 insolubles. Las Lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un cañón altamente conservado que soporta cuatro bucles en una terminal de la proteína. Estos bucles forman la entrada a una bolsa de adhesión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula son las responsables de la variación en la especificidad de adhesión entre Lipocalinas individuales.

10 Aunque la estructura general de los bucles hipervariables soportados por una estructura de lámina β conservada es reminiscente de las inmunoglobulinas, las Lipocalinas difieren considerablemente de los anticuerpos en términos de tamaño, ya que están compuestas de una cadena polipeptídica única de 160–180 aminoácidos que es marginalmente más grande que un dominio de inmunoglobulina único.

15 Las Lipocalinas pueden estar clonadas y sus bucles sometidos a manipulación de ingeniería genética para crear Anticalinas. Se han generado colecciones de Anticalinas estructuralmente diversas y la exhibición de Anticalinas permite la selección y rastreo de la función de adhesión, seguido de la expresión y producción de proteínas solubles para otros análisis en sistemas procarióticos o eucarióticos. Los estudios han demostrado que pueden desarrollarse Anticalinas que son específicas para virtualmente cualquier proteína diana humana, y que pueden obtenerse

20 afinidades de adhesión en el rango nanomolar o superior.

Las Anticalinas pueden formatearse también como proteínas de diana dual (Duocalinas). Una Duocalina se adhiere a dos dianas terapéuticas separadas en una proteína monomérica que es fácilmente producida usando procesos de

25 manufactura convencionales, al mismo tiempo que retiene especificidad y afinidad de la diana independientemente de la orientación estructural de sus dos dominios de adhesión.

La modulación de dianas múltiples a través de una molécula única es particularmente ventajosa en enfermedades que se sabe que involucran más de un factor causante. Además, los formatos de adhesión bi- o multivalentes tales como Duocalinas tienen un potencial significativo en hacer diana en las moléculas de superficie celular en

30 enfermedades, mediando en los efectos agonísticos sobre las vías de transducción de señales o induciendo efectos de internalización mejorados a través de la adhesión y agregación de receptores de superficie celular. Además, la elevada estabilidad intrínseca de las Duocalinas es comparable con las Anticalinas monoméricas.

Información adicional con respecto a las Anticalinas puede hallarse en la Patente Norteamericana 7.250.297 y en la

35 WO 99/16873, incorporándose ambas aquí como referencia en su totalidad.

Los Avímeros son otro tipo de tecnología mimética de anticuerpos que es útil en el contexto de la presente invención. Los Avímeros han evolucionado de una gran familia de dominios receptores extracelulares humanos, mediante entremezclado de exon *in vitro* y exhibición de fagos, generando proteínas de multidominio con

40 propiedades inhibitorias y de adhesión. Al unir múltiples dominios de adhesión independientes, se ha demostrado que crea fuerza y da como resultado una afinidad y especificidad mejorada en comparación con proteínas de adhesión convencionales de un solo epítipo. Otras ventajas potenciales incluyen una producción simple y eficiente de moléculas específicas de multidianas en *Escherichia coli*, termoestabilidad mejorada y resistencia a las proteasas. Se han obtenidos Avímeros con afinidades sub-nanomolares contra varias dianas. Información adicional con respecto a los Avímeros puede hallarse en las Patentes Norteamericanas 2006/0286603, 2006/0234299,

45 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756, todas las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Los Versacuerpos son otra tecnología mimética de anticuerpos que puede usarse en el contexto de la presente invención. Los Versacuerpos son proteínas pequeñas de 3–5 kDa con >15 % de cisteínas, que forman un andamiaje de alta densidad de disulfuro que reemplaza el núcleo hidrofóbico que tienen las proteínas típicas. Este reemplazo da como resultado que una proteína sea más pequeña, sea más hidrofílica (es decir, menos propensa a la

50 agregación y de adhesión no específica), que sea más resistente a las proteasas y al calor, y que tenga una densidad inferior de epítopos de células T, debido a que los residuos que contribuyen más a la presentación de MHC son hidrofóbicos. Es bien conocido el hecho de que estas cuatro propiedades afectan la inmunogenicidad, y se espera que conjuntamente causarán una gran disminución de inmunogenicidad.

Dada la estructura de los Versacuerpos, estos miméticos de anticuerpos ofrecen un formato versátil que incluye multi-valencias, multi-especificidad, diversos mecanismos de vida media, módulos que hacen diana en los tejidos y

60 la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, los Versacuerpos son manufacturados en *E. coli* con altos rendimientos y debido a su hidrofiliidad y pequeño tamaño, los Versacuerpos son sumamente solubles y pueden formularse en concentraciones elevadas. Los Versacuerpos son excepcionalmente estables al calor y ofrecen una vida media extendida. Información adicional con respecto a Versacuerpos puede hallarse en la Patente Norteamericana 2007/0191272, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

65

No se pretende que las descripciones anteriores de tecnologías miméticas y fragmentos de anticuerpos sean exhaustivas. Varias tecnologías adicionales que incluyen tecnologías alternativas a base de polipéptidos tales como fusiones de regiones determinantes de complementariedad tal como se han señalado en Qui *et al.*, Nature Biotechnology, 25(8) 921–929 (2007), así como también tecnologías a base de ácidos nucleicos tales como las tecnologías de aptámeros de ARN descritas en las Patentes Norteamericanas 5.789.157; 5.864.026; 5.712.375; 5.763.566; 6.013.443; 6.376.474; 6.613.526; 6.114.120; 6.261.774; y 6.387.620; todas las cuales se incorporan aquí como referencia, podrían usarse en el contexto de la presente invención.

Propiedades Físicas de los Anticuerpos

Los anticuerpos de esta descripción pueden caracterizarse mediante varias propiedades físicas para detectar y/o diferenciar las clases de los mismos.

Los anticuerpos de la presente descripción pueden contener uno o más sitios de glicosilación ya sea en la región variable de cadena ligera o de cadena pesada. Dichos sitios de glicosilación pueden dar como resultado un aumento de la inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo debido a la adhesión alterada al anticuerpo (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673–702; Gala y Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489–94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099–109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R–56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452–7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697–706). Se sabe que la glicosilación ocurre en motivos que contienen una secuencia N–X–S/T. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti–mesotelina que no contenga glicosilación de región variable. Esto puede lograrse ya sea seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable o bien mutando residuos dentro de la región de glicosilación.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente descripción no contienen sitios de isomerismo de asparagina. La desamidación de asparagina puede ocurrir en las secuencias N–G o D–G y puede dar como resultado la creación de un residuo de ácido isoaspártico que introduce un rulo en la cadena polipeptídica y disminuye su estabilidad (efecto de ácido isoaspártico).

Cada anticuerpo tendrá un punto isoelectrico único (pI), que generalmente entra dentro del rango de pH comprendido entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 entra típicamente dentro del rango de pH de 7–9.5 y el pI para un anticuerpo IgG4 cae típicamente dentro de un rango de 6–8. Hay especulación en lo que se refiere a que los anticuerpos con un pI fuera del rango normal pueden tener desdoblamiento e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. Por lo tanto, se prefiere que un anticuerpo de anti–mesotelina contenga un valor pI que caiga dentro del rango normal. Esto puede lograrse seleccionando anticuerpos con un pI dentro del rango normal o por mutación de residuos superficiales cargados.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión característica, donde la temperatura de fusión más alta indica mayor estabilidad general *in vivo* (Krishnamurti R y Manning MC (2002) *Curr Farm Biotechnol* 3:361–71). Generalmente, se prefiere que la T_{M1} (la temperatura de desdoblamiento inicial) sea superior a 60 °C, preferiblemente superior a 65 °C, aún más preferiblemente superior a 70 °C. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse usando calorimetría exploratoria diferencial (Chen *et al* (2003) *Farm Res* 20:1952–60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47–52) o dicroísmo circular (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343–9).

En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degraden rápidamente. La degradación de un anticuerpo puede medirse usando electroforesis capilar (CE) y MALDI–MS (Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626–32).

En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tengan efectos mínimos de agregación, lo cual puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmunitaria indeseable y/o a propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos son aceptables cuando tienen una agregación del 25 % o menos, preferiblemente 20 % o menos, aún más preferiblemente 15 % o menos, aún más preferiblemente 10 % o menos y aún más preferiblemente 5 % o menos. La agregación puede medirse mediante varias técnicas incluyendo columna de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y dispersión de luz.

Métodos de manipulación genética de anticuerpos

Tal como se discutió anteriormente, los anticuerpos de anti–mesotelina que tienen secuencias de V_H y V_L conocidas pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti–mesotelina mediante la modificación de los mismos o de las regiones constantes adheridas a ellos. Por lo tanto en otro aspecto de esta descripción, las características estructurales de un anticuerpo anti–mesotelina conocido, por ejemplo, 3C10, 6A4 o 7B1, se usan para crear anticuerpos de anti–mesotelina estructuralmente relacionados que retienen por lo menos una propiedad funcional de los anticuerpos de esta descripción tal como adhesión a mesotelina humana. Por ejemplo, una o más regiones CDR de anticuerpos anti–mesotelina conocidos o mutaciones de los mismos, pueden combinarse recombinantemente con regiones de estructura conocida y/o otras CDRs para crear anticuerpos anti–mesotelina de esta descripción, manipulados recombinantemente, adicionales, tal como los discutidos anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas que se describieron en la sección previa. El material de partida para el método de manipulación es

una o más de las secuencias V_H y/o V_L que se proveen aquí, o una o más de las regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo manipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más secuencias de V_H y/o V_L que se proveen aquí, o una o más regiones CDR de las mismas. En vez de esto, la información contenida en las secuencias se usará como material de partida para crear

5 secuencias de “segunda generación” derivadas de las secuencias originales y luego se prepararán las secuencias de “segunda generación” y se expresarán como proteína.

Por consiguiente, en otra realización esta descripción provee un método para preparar un anticuerpo anti-mesotelina que comprende:

- 10 (a) proveer: (i) una secuencia de anticuerpo V_H que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 1–3, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 4–6, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 7–9; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo V_L que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs:
- 15 10–12, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 13–15, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 16–18;
- (b) alterar por lo menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo V_L y/o la secuencia de anticuerpo V_L para crear por lo menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
- 20 (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Pueden usarse técnicas de biología molecular convencionales para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

En ciertas realizaciones, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente o selectivamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificadora de anticuerpo de anti-mesotelina y los anticuerpos anti-mesotelina modificadores resultantes pueden ser rastreados para determinar la actividad de adhesión y/o otras propiedades funcionales tal como las que se describen aquí. Los métodos mutacionales han sido descritos en la materia. Por ejemplo, la WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y rastrear mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, ensamblado de ligación sintética o una combinación de éstos. Alternativamente, la WO

30 03/074679 de Lazar *et al.* describe métodos para usar métodos de rastreo computacional para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican los Anticuerpos de la Invención

35 Otro aspecto de esta descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de esta descripción. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de células o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es “aislado” o “convertido a sustancialmente puro” cuando es depurado de otros componentes u otros contaminantes celulares, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas convencionales que incluyen tratamiento alcalino/ /SDS, bandeado de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis de gel de agarosa y otras bien conocidas en la materia. Ver, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de esta descripción puede ser por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

45 Los ácidos nucleicos de esta descripción pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos portadores de genes de inmunoglobulina humana tal como se describirán adicionalmente a continuación), los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo preparadas por los hibridomas, pueden obtenerse por técnicas convencionales de amplificación de PCR o de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de

50 una genoteca de inmunoglobulina, por ejemplo, usando técnicas de exhibición de fagos), un ácido nucleico que codifica dichos anticuerpos puede ser recuperado de la genoteca.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas son aquellas que codifican las secuencias V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 3C10, 6A4 o 7B1. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_H de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs: 25–27, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_L de 3C10, 6A4 y 7B1 se muestran en las SEC ID NOs: 28–30, respectivamente.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L estos fragmentos de ADN pueden ser adicionalmente manipulados mediante técnicas de ADN recombinantes convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud total, a genes de fragmento Fab, o a genes scFv. En estas manipulaciones, un fragmento que codifica V_L – o V_H – está ligado operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un ligador flexible. El término “ligado operativamente” tal como se usa en este contexto, significa que los dos fragmentos de ADN están unidos de manera que las secuencias de aminoácido codificadas por los mismos permanecen enmarcadas.

- El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse a un gen de cadena pesada de longitud total ligando operativamente el ADN codificador de V_H a una molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana son conocidas en la materia (ver por ejemplo, Kabat '242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones, las cuales pueden obtenerse mediante amplificación de PCR convencional. Las regiones constantes de cadena pesada pueden ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar ligado operativamente a una molécula de ADN que codifica únicamente la región constante CH1 de cadena pesada.
- El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse a un gen de cadena ligera de longitud total (así como también un gen de cadena ligera de Fab) ligando operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana son conocidas en la materia (ver por ejemplo, Kabat '242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación de PCR convencional. En realizaciones preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.
- Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L están ligados operativamente a otro fragmento que codifica un ligador flexible, por ejemplo, codifica una secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de modo que las secuencias V_H y V_L puedan ser expresadas como proteína de cadena única contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por un ligador flexible (ver por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Producción de Anticuerpos Monoclonales de esta Descripción

- Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente descripción pueden producirse mediante varias técnicas, incluyendo la técnica de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio pueden emplearse otras técnicas, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.
- El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para aislar esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la materia. Los asociados de fusión (por ejemplo células de mieloma murino) y procedimientos de fusión también son conocidos.
- Pueden prepararse anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente descripción basados en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado tal como se describió anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y de cadena ligera puede obtenerse a partir de un hibridoma no humano de interés y manipularse de manera de contener secuencias de inmunoglobulinas no murinas (por ejemplo humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, regiones variables murinas pueden ligarse con regiones constantes humanas (ver por ejemplo, la Patente Norteamericana 4.816.567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, pueden insertarse regiones CDR murinas en una estructura humana (ver por ejemplo, Patente Norteamericana 5.225.539 de Winter, y Patente Norteamericana 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).
- Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos. Pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos portadores de partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los de los tipos HuMAb Mouse[®] y KM Mouse[®], respectivamente, y se denominan colectivamente aquí "ratones de Ig humana."
- El tipo de ratón HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) contiene minilugares génicos de inmunoglobulina humana que codifican secuencias no reordenadas de inmunoglobulina humana de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ, conjuntamente con mutaciones guiadas por diana, que inactivan los lugares endógenos de cadena μ y κ (ver por ejemplo, Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben expresión reducida de IgM o κ, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, sufren un cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGκ de alta afinidad humana (Lonberg *et al.* (1994), *supra*; revisado en Lonberg (1994) *Handbook de Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg y Huszar (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding y Lonberg (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y uso del tipo de ratones HuMAb Mouse[®] y las modificaciones genómicas de las cuales son portadores los ratones, se describen adicionalmente en Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, el contenido de todas las cuales se incorpora específicamente aquí como referencia en su totalidad. Ver además, Patentes Norteamericanas 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; Patente Norteamericana 5.545.807 de Surani *et al.*; WO 92/03918. WO 93/12227. WO 94/25585.

WO 97/13852. WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y WO 01/14424 de Korman *et al.* También pueden usarse ratones transgénicos portadores de genes de cadena ligera lambda humana, tal como los descritos en la WO 00/26373 de Bruggemann. Por ejemplo, un ratón portador de un transgen de cadena lambda humana puede cruzar la raza con un ratón portador de un transgen de cadena pesada humana (por ejemplo, HCo7), y

5 opcionalmente portador también de un transgen de cadena ligera kappa humana (por ejemplo, KCo5) para crear un ratón portador de ambos transgenes, el de cadena pesada y de cadena ligera humana (ver por ejemplo, Ejemplo 1).

En otra realización, los anticuerpos humanos de esta descripción pueden generarse usando un ratón que es portador de secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como uno que es

10 portador de un transgen de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Este ratón se denomina aquí KM Mouse[®] y el linaje o tipo se describen en forma detallada en la WO 02/43478 de Ishida *et al.*

Además, los sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana se encuentran disponibles en la materia y pueden usarse para crear los anticuerpos anti-mesotelina de esta

15 descripción. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones han sido descritos en, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati *et al.*

Además, se encuentran disponibles en la materia sistemas alternativos de animales transcromosómicos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para generar anticuerpos anti-mesotelina de esta

20 descripción. Por ejemplo, pueden usarse ratones portadores tanto de un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados aquí "ratones TC"; dichos ratones han sido descritos en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han dado a conocer vacas portadoras de transcromosomas de cadena ligera y pesada humana (ver por ejemplo, Kuroiwa *et al.* (2002)

25 *Nature Biotechnology* 20:889-894 y WO 2002/092812).

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de esta descripción usando métodos de exhibición de fagos para rastrear genotecas de genes de inmunoglobulina humana. Ver por ejemplo, las Patentes Norteamericanas 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner *et al.*; Patente Norteamericana 5.427.908 y

30 5.580.717 de Dower *et al.*; Patente Norteamericana 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferti *et al.*; y Patente Norteamericana 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths *et al.*

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de esta descripción usando ratones SCID en los cuales se han reconstituido células inmunitarias humanas de modo de poder generar una respuesta de anticuerpo humano mediante inmunización. Dichos ratones han sido descritos en las Patentes Norteamericanas 5.476.996 y

35 5.698.767 to Wilson *et al.*

En otra realización, se preparan anticuerpos anti-mesotelina humana usando una combinación de técnicas de exhibición de fagos y ratón de Ig humana tal como se describió en la Patente Norteamericana 6.794.132 de Buechler

40 *et al.* Más específicamente, el método involucra crear primero una respuesta de anticuerpo anti-mesotelina, en un ratón de Ig humana, tal como los de los linajes HuMab Mouse[®] o KM Mouse[®] mediante inmunización del ratón con uno o más antígenos de mesotelina, seguido de aislamiento de ácidos nucleicos que codifican cadenas de anticuerpo humano de células linfáticas de ratón e introducción de estos ácidos nucleicos en un vector de exhibición (por ejemplo fagos) para proporcionar una genoteca de paquetes de exhibición. Por lo tanto, cada miembro de la

45 genoteca comprende un ácido nucleico que codifica una cadena de anticuerpo humana y cada cadena de anticuerpo es exhibida desde el paquete de exhibición. La genoteca puede ser luego rastreada con proteína de mesotelina para aislar los miembros de la genoteca que se adhieren específicamente a la mesotelina. Los insertos de ácido nucleico de los miembros de la genoteca seleccionada son luego aislados y secuenciados por métodos convencionales para determinar las secuencias variables de cadena ligera y de cadena pesada de las adhesiones de mesotelina

50 seleccionadas. Las regiones variables pueden ser convertidas a cadenas de anticuerpos de longitud total mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, tales como la clonación de las regiones variables en un vector de expresión que es portador de las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera tal como la región V_H que está operativamente ligada a la región C_H y la región V_L que está operativamente ligada a la región C_L.

55 Inmunización de ratones de Ig Humana

Cuando se usan ratones de Ig humana para generar los anticuerpos humanos de esta descripción, dichos ratones pueden ser inmunizados con una preparación purificada o enriquecida del antígeno de mesotelina y/o una proteína recombinante, donde las células expresan una proteína de mesotelina, o una proteína de fusión de mesotelina, tal como se describió en Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 845-851; y WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones son de 6-16 semanas de edad en el momento de la primera infusión. Por ejemplo, se usa una preparación recombinante o purificada (5-50 µg) de antígeno de mesotelina para inmunizar ratones de Ig humana intraperitonealmente y/o sub-cutáneamente. Más preferiblemente, el inmunógeno que se usa para crear los anticuerpos de esta descripción es una proteína de fusión

60 de mesotelina que comprende el dominio extracelular de una proteína de mesotelina fusionado en su N-terminal con un polipéptido que no es mesotelina (por ejemplo, un marbete His) (ver Ejemplo 1).

Los procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos que se adhieren a mesotelina humana, se describen en el Ejemplo 1. La experiencia acumulativa con varios antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos del tipo de ratón HuMAb responden cuando se inmunizan inicialmente intraperitonealmente (IP) con antígeno en coadyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP una semana sí y otra no (por un total de 6), con antígeno en coadyuvante incompleto de Freund. Los coadyuvantes distintos del de Freund (por ejemplo, coadyuvante RIBI) son también eficaces. Además, las células enteras en ausencia de coadyuvante demostraron que eran altamente inmunogénicas. Las respuestas inmunitarias pueden monitorearse en el curso del protocolo de inmunización, con muestras de plasma obtenidas por desangrado retroorbital. El plasma puede ser rastreado mediante ELISA, y pueden usarse para las fusiones los ratones con valoraciones suficientes de inmunoglobulina humana anti-mesotelina. Los ratones pueden ser reforzados intravenosamente con antígeno, por ejemplo, tres días antes del sacrificio y con remoción del bazo. Se supone que pueden necesitarse 2–3 fusiones para cada inmunización. Entre 6 y 24 ratones son típicamente inmunizados para cada antígeno. Usualmente, se usan ambas cepas la HCo7 y la HCo12. Además, ambos transgenes, el HCo7 y HCo12 pueden crearse conjuntamente en un solo ratón que tiene dos transgenes de cadena pesada o humana diferentes (HCo7/HCo12). Alternativamente o adicionalmente, puede usarse la cepa de KM Mouse®.

Generación de Anticuerpos Monoclonales Humanos Productores de Hibridomas de la Invención

Para generar anticuerpos monoclonales humanos productores de hibridomas de esta descripción, esplenocitos y/o células nodulares linfáticas de ratones inmunizados, se aíslan y fusionan en una línea de célula inmortalizada apropiada tal como una línea de célula de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes son rastreados para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se fusionan suspensiones de células únicas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados hasta una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretadoras P3X63–Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50 % de PEG. Alternativamente, la suspensión de células únicas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados, puede fusionarse por electrofusión, usando un electroporador de células de cámara grande CitoPulse (CitoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie, Maryland). Las células se depositan a razón de aproximadamente 2×10^5 en una placa microevaluatora de fondo plano seguido de incubación de dos semanas en un medio selectivo que contiene 20 % de suero clónico fetal, 18 % de “Medio Acondicionado 653”, 5 % de (IGEN) de origen, 4 mM de L–glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 5mM de HEPES, 0.055 mM de 2–mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se agregó 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, se cultivan las células en un medio en el cual el HAT es reemplazado con HT. Los receptáculos individuales son luego rastreados mediante ELISA para determinar los anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que ocurre un desarrollo extenso de hibridomas, se observa el medio, usualmente después de 10–14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos son re-depositados, rastreados nuevamente y si todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales son subclonados por lo menos dos veces por dilución limitativa. Subclones estables son luego cultivados *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpos en un medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales, se cultivan hibridomas seleccionados en frascos giratorios de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de cromatografía de afinidad con la proteína A–sefarosa (Farmacia, Piscataway, N.J.). Las fracciones de IgG eluidas son luego controladas mediante electroforesis de gel y HPLC para asegurar la pureza. La solución buffer es intercambiada en PBS, y la concentración se determina mediante OD280 usando un coeficiente de extinción de 1.43. Los anticuerpos monoclonales se dividen en alícuotas y se almacenan a –80 °C.

Generación de Anticuerpos Monoclonales Productores de Transfectomas de la Invención

Los anticuerpos de esta descripción pueden producirse también en un transfectoma de célula huésped usando por ejemplo una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica tal como es bien conocida en la materia (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o sus fragmentos de anticuerpos, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, se obtienen mediante técnicas de biología molecular convencionales, (por ejemplo, amplificación de PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y se insertan los ADNc en los vectores de expresión de modo que los genes queden ligados operativamente a las secuencias de control transcripcionales y translationales. En este contexto el término, “ligado operativamente” significa que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de modo que las secuencias de control de transcripción y transducción dentro del vector cumplen la función propuesta de regulación de transcripción y transducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen de manera que sean compatibles con la célula huésped de expresión que se usa. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo son insertados en vectores separados, o más típicamente, ambos genes son insertados dentro del mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo son insertados en el vector de expresión mediante métodos convencionales (por ejemplo, ligación de los sitios de restricción complementarios en el fragmento y vector de gen de anticuerpo, o ligación de extremo como si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada de los anticuerpos que se describen aquí se usan para

crear genes de anticuerpos de longitud total de cualquier isotipo de anticuerpo mediante la inserción de los mismos en los vectores de expresión que ya están codificando regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena ligera del isotipo deseado, de modo que el segmento V_H esté ligado operativamente a los segmentos C_H dentro del vector y que el segmento V_L esté ligado operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido de señal esté ligado enmarcado en el terminal amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heteróloga, es decir, un péptido de señal de una proteína no inmunoglobulínica.

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de esta descripción son portadores de secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena del anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo señales de poli-adenilación) que controlan la transcripción o transducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se han descrito por ejemplo en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión incluyendo la selección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que debe transformarse, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen los niveles elevados de expresión de proteína en células de mamíferos, tales como aquellos que derivan de citomegalovirus (MV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus principal (AdMLP) y poliomas. Alternativamente, pueden usarse secuencias reguladoras no virales tales como promotor de ubiquitina o promotor de β-globina. Además, elementos reguladores compuestos de secuencias de fuentes diferentes tales como el sistema promotor SRα que contiene secuencias del promotor precoz SV40 y de la repetición terminal larga del tipo 1 del virus de leucemia de célula T humana (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además, de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de esta descripción pueden ser portadores de secuencias adicionales tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales ha sido introducido el vector (ver por ejemplo Patentes Norteamericanas 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas las cuales son de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual ha sido introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para ser usado en dhfr⁻ células huésped con selección/amplificación de metotrexato) y el neo gen (para selección G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, los vectores de expresión que los codifican son transfectados a una célula huésped. Las varias formas del término "transfección" abarcan una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de esta descripción tanto en células huésped procarióticas como eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas y más preferiblemente en células de mamífero, es la que se prefiere debido a que éstas tienen más probabilidades de ensamblarse y secretar un anticuerpo adecuadamente doblado e inmunológicamente activo, que las células procarióticas.

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de esta descripción incluyen (células CHO de ovario de hámster chino) (que incluyen células CHO dhfr⁻, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, tal como se describió en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma de NSO, células COS y células SP2. En particular, para ser usado con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génico GS descrito en WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338,841 (de Bebbington). Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células huésped por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en la célula huésped, o más preferiblemente la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se desarrollan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteína convencionales.

60 Caracterización de Adhesión de Anticuerpo al Antígeno

Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse para adherirse a mesotelina humana mediante, por ejemplo, ELISA standard. Resumiendo, las placas microevaluadoras son recubiertas con proteína de mesotelina purificada y/o recombinante (ver por ejemplo, Ejemplo 1), a 1 μg/ml en PBS, y luego pueden bloquearse con 5 % de albúmina de suero bovino en PBS. Se agregan diluciones de anticuerpo (por ejemplo diluciones de plasma de ratones inmunizados con mesotelina a cada receptáculo y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con

PBS/Tween y luego se incuban con reactivos secundarios (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico de Fc-de IgG anti-humano de cabra) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Después de lavarlas, las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a OD de 405–650. Preferiblemente, se usan para las fusiones ratones que desarrollan las valoraciones más elevadas.

5 También puede usarse un ensayo ELISA tal como el descrito anteriormente para rastrear hibridomas que muestran reactividad positiva con una proteína de mesotelina. Los hibridomas que se adhieren con alta fuerza y/o afinidad a una proteína de mesotelina son subclonados y luego caracterizados. Un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células principales (mediante ELISA) puede elegirse para preparar un frasco de 5–10 de un banco de células almacenado a –140 °C, y para la purificación de anticuerpos.

15 Para purificar anticuerpos de anti-mesotelina, se cultivan hibridomas seleccionados en frascos giratorios de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Se filtran los sobrenadantes y se concentran antes de cromatografía por afinidad con proteína A-sepharose (Farmacia, Piscataway, NJ). Las fracciones de IgG eluidas son controladas mediante electroforesis de gel y HPLC para asegurar la pureza. La solución buffer es intercambiada en PBS, y la concentración es determinada por OD280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se dividen en alícuotas y se almacenan a –80 °C.

20 Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-mesotelina seleccionados se adhieren a epítopos únicos, cada anticuerpo es biotinilado usando reactivos comercialmente obtenibles (Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competición usando anticuerpos monoclonales no rotulados y anticuerpos monoclonales biotinilados se llevan a cabo usando placas ELISA recubiertas con la proteína mesotelina tal como se describió anteriormente. La adhesión de mAb biotinilada puede detectarse con una sonda de strep-avidina-alcalina fosfatasa.

25 Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados pueden efectuarse isotipos ELISAs usando reactivos específicos para un isotipo particular. Por ejemplo para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, receptáculos de placas microevaluadoras pueden ser recubiertas con 1 µg/ml de inmunoglobulina anti-humana durante la noche a 4 °C. Después de bloquear con 1 % de BSA, las placas se dejan reaccionar con 1 µg /ml o menos de anticuerpos monoclonales de ensayo o de controles de isotipo purificados a temperatura ambiente durante una a dos horas. Luego los receptáculos se hacen reaccionar con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específica de IgG1 humana o IgM-humana. Se revelan placas y se analizan tal como se describió anteriormente.

35 Las IgGs humanas de anti-mesotelina pueden ensayarse también para determinar la reactividad con un antígeno de mesotelina mediante borrarón Western. Resumiendo, se prepara un antígeno de mesotelina y se somete a electroforesis con gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio. Los antígenos separados son transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados con 10 % de suero de ternero fetal, y sondeados con los anticuerpos monoclonales sometidos a ensayo. La adhesión de IgG humana se detecta usando fosfatasa alcalina de IgG anti-humana y se revela con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

40 La especificidad de adhesión de un anticuerpo de esta descripción puede determinarse monitoreando la adhesión del anticuerpo a células que expresan una proteína de mesotelina, por ejemplo, por citometría de flujo. Pueden usarse células o líneas de células que expresan naturalmente la proteína mesotelina tales como OVCAR3, NCI-H226, CFPAC-1 o KB, o puede transfectarse una línea de células tal como una línea de células CHO con un vector de expresión que codifica mesotelina de manera que la mesotelina se exprese en la superficie de la célula. La proteína transfectada puede comprender un marbete tal como un marbete myc-tag o un marbete his-tag, preferiblemente en el N-terminal para la detección, usando un anticuerpo para el marbete. La adhesión de un anticuerpo de esta descripción a una proteína mesotelina puede determinarse por incubación de las células transfectadas con el anticuerpo, y puede detectarse el anticuerpo adherido. La adhesión de un anticuerpo al marbete en la proteína transfectada puede usarse como control positivo.

50 Moléculas Biespecíficas

En otro aspecto, la presente descripción caracteriza moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-mesotelina o un fragmento del mismo de esta descripción ligadas a otra molécula funcional, por ejemplo auto-péptido o proteína tal como un anticuerpo, un mimético de adhesión o un ligando para un receptor, que se adhieren a por lo menos a dos sitios de adhesión o moléculas diana diferentes. El anticuerpo de esta descripción puede estar ligado en realidad a más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se adhieren a más de dos sitios de adhesión diferentes y/o a moléculas diana. Dichas moléculas multiespecíficas están abarcadas también por el término "molécula biespecífica", tal como se usa aquí. La ligadura puede ser por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otra.

65 Por consiguiente, la presente descripción incluye moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de adhesión para mesotelina y una segunda especificidad de adhesión para un segundo epítipo diana. En una realización particular de esta descripción, el segundo epítipo diana es un receptor Fc, por ejemplo, un FcγRI (CD64) humano o un receptor Fcα humano (CD89). Por lo tanto, esta descripción incluye moléculas biespecíficas que son capaces de adherirse tanto a células efectoras que expresan FcγR como a FcαR

(por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs)), y a células diana que expresan la proteína mesotelina. Estas moléculas biespecíficas guían células que expresan mesotelina a células efectoras, y desencadenan actividades de células efectoras mediadas por el receptor Fc, tal como fagocitosis de células que expresan mesotelina, ADCC, liberación de citocina o generación del anión superóxido.

5 Cuando la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además, una tercera especificidad de adhesión, además de una especificidad de adhesión a un anti-Fc y una especificidad de adhesión anti-mesotelina. En una realización, la tercera especificidad de adhesión es una porción del factor de anti-incremento (EF), por ejemplo, una molécula que se adhiere a una proteína superficial que está involucrada en actividad citotóxica y que
10 por lo tanto aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula diana. La "porción de factor de anti-incremento" puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional, o un ligando que se adhiere a una molécula determinada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y que por lo tanto, da como resultado un incremento del efecto de los determinantes de adhesión para el receptor Fc o antígeno celular diana. La "porción del factor anti-incremento" puede adherirse a un receptor Fc o a un antígeno celular diana. Alternativamente, la porción del factor anti-incremento puede adherirse a cualquier entidad que sea diferente de la entidad a la cual se adhieren la primera y
15 segunda especificidades de adhesión. Por ejemplo, la porción del factor anti-incremento puede adherirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1) u otra célula inmunitaria que da como resultado un aumento de la respuesta inmunitaria contra la célula diana.

20 En una realización, las moléculas biespecíficas de esta descripción comprenden como especificidad de adhesión por lo menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluye por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb o una cadena Fv única. El anticuerpo puede ser también un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una construcción de cadena única tal como se describió en la Patente Norteamericana 4.946.778 de Ladner *et al.*, el contenido de la cual se incorpora expresamente aquí como
25 referencia.

En una realización, la especificidad de adhesión para un receptor Fc γ se provee mediante un anticuerpo monoclonal, la adhesión del cual no está bloqueada por inmunoglobulina humana G (IgG). Tal como se usa aquí, el término "receptor IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena y situados en el cromosoma 1. Estos genes
30 codifican un total de doce isoformas receptoras de transmembrana o solubles que están agrupadas en tres clases de receptor Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD16). En una realización preferida, el receptor Fc γ es el receptor humano de alta afinidad Fc γ RI. El Fc γ RI es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad para IgG monomérica ($10^8 - 10^9 M^{-1}$).

35 La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fc γ preferidos se describen en la WO 88/00052 y en la Patente Norteamericana 4.954.617 de Fanger *et al.*, que se incorporan en forma completa aquí como referencia. Estos anticuerpos se adhieren a un epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII en un sitio que es distinto del sitio de adhesión de Fc γ del receptor, y por lo tanto, su adhesión no es bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Anticuerpos específicos anti-Fc γ RI útiles en esta descripción son mAb 22, mAb 32, mAb 44,
40 mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 es obtenible en American Type Culture Collection, ATCC No. de Acceso HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo receptor anti-Fc γ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 ha sido descrita en Graziano, R.F. *et al.* (1995) *J. Immunol* **155** (10): 4996-5002 y WO 94/10332 de Tempest *et al.* La línea de célula productora de anticuerpo H22 fue depositada en American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1 y tiene el número
45 de acceso CRL 11177.

En otra realización preferida, la especificidad de adhesión para un receptor Fc se provee mediante un anticuerpo que se adhiere a un receptor IgA humano, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), la adhesión del cual preferiblemente no está bloqueada por una inmunoglobulina humana (A (IgA)). El término "receptor IgA" incluye el
50 producto génico de un alfa-gen (Fc α RI) situado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas de transmembrana empalmadas alternativamente de 55 a 110 kDa. El Fc α RI (CD89) está expresado constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinofílicos y neutrofílicos, pero no en poblaciones de células no efectoras. El Fc α RI tiene una afinidad media ($\approx 5 \times 10^7 M^{-1}$) tanto para IgA1 como para IgA2, que aumenta por exposición a citocinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* **16**:423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales Fc α RI identificados como A3, A59, A62 y A77, que adhieren Fc α RI fuera del dominio de adhesión del ligando IgA (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* **148**:1764).

60 Los Fc α RI y Fc γ RI son los receptores desencadenantes preferidos para ser usados en las moléculas biespecíficas de esta descripción debido a que (1) están expresados principalmente en células efectoras inmunitarias, por ejemplo, monocitos, PMNs, macrófagos y células dendríticas; (2) expresan a niveles elevados (por ejemplo, 5,000-100,000 por célula); (3) son mediadores de las actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) son intermediarios del incremento de presentación de antígeno, en los antígenos, incluyendo auto-antígenos, enviados a éstos.
65

Aunque se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de esta descripción son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

5 Las moléculas biespecíficas de la presente descripción pueden prepararse conjugando las especificidades de adhesión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de adhesión anti-FcR y anti-mesotelina usando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, cada especificidad de adhesión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y luego puede conjugarse una a la otra. Cuando las especificidades de adhesión son proteínas o péptidos, pueden usarse para conjugación covalente varios agentes de acoplamiento o de entrecruzamiento. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenil dimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver, por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* **160**:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* **229**:81-83, y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**: 2367-2375). Los agentes conjugadores preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

20 Cuando las especificidades de adhesión son anticuerpos, estos pueden conjugarse a través de unión vía sulfhidrilo de las regiones de bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región de bisagra está modificada para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

25 Alternativamente, ambas especificidades de adhesión pueden ser codificadas en el mismo vector y expresadas y reunidas en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de esta descripción puede ser una molécula de cadena única que comprende un anticuerpo de cadena única y un determinante de adhesión, o una molécula biespecífica de cadena única que comprende dos determinantes de adhesión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender por lo menos dos moléculas de cadena única. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en las Patentes Norteamericanas 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; y 5.482.858, todas las cuales se incorporan expresamente aquí como referencia.

35 La adhesión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse por ejemplo mediante ensayo ELISA, radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento) o borrón Western. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la presencia de complejos de interés de proteína-anticuerpo mediante el empleo de un reactivo rotulado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Los complejos de FcR puede ser detectados usando por ejemplo, un anticuerpo ligado a enzima o un fragmento de anticuerpo que reconoce y se adhiere específicamente a los complejos de anticuerpos FcR. Alternativamente, los complejos pueden ser detectados usando cualquiera de varios inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar rotulado radioactivamente y puede usarse en un radio-inmunoensayo (RIA) (ver por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, Marzo 1986, que se incorpora aquí como referencia). El isotopo radioactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador de centelleo o por autorradiografía. Conjugados

45 En otro aspecto, se provee un conjugado de anticuerpo-molécula asociada, donde la molécula asociada está conjugada con un anticuerpo de esta invención mediante un ligador químico (denominado algunas veces aquí, simplemente como "ligador"). La molécula asociada puede ser un agente terapéutico o un marcador. El agente terapéutico puede ser por ejemplo una citotoxina, un fármaco no citotóxico (por ejemplo un inmunosupresor), un agente radioactivo, otro anticuerpo o una enzima. Preferiblemente la molécula asociada es una citotoxina. El marcador puede ser cualquier rótulo que genere una señal detectable tal como un radiorrotulado, un rótulo fluorescente o una enzima que catalice una modificación detectable para un sustrato. El anticuerpo cumple una función de envío a la diana: cuando se adhiere a un tejido o célula diana, donde se encuentra su antígeno, el anticuerpo guía al conjugado hasta el tejido o célula diana. Allí, el ligador es disociado, liberando la molécula asociada para llevar a cabo su función biológica deseada. En algunos casos, el conjugado es internalizado dentro de una célula diana y ocurre la disociación dentro de la misma.

55 Ligadores

60 En algunas realizaciones, el ligador es un ligador peptídico, descrito aquí como (L⁴)_p-F-(L¹)_m. Otros ligadores incluyen ligadores hidrazina y disulfuro, descritos aquí como (L⁴)_p-H-(L¹)_m y (L⁴)_p-J-(L¹)_m, respectivamente. F, H, y J son peptídico, hidrazina, y restos disulfuro, respectivamente, que son disociables para liberar la molécula asociada del anticuerpo, mientras que L¹ y L⁴ son grupos ligadores. F, H, J, L¹, y L⁴ se definen en forma más completa en lo que antecede junto con los suscritos p y m. La preparación y uso de estos y otros ligadores ha sido descrito en la WO 2005/112919, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

65

El uso de peptidilo y otros ligadores en conjugados de anticuerpo-asociado, han sido descritos en las Patentes Norteamericanas 2006/0004081; 2006/0024317; 2006/0247295; 6,989,452; 7,087,600; y 7,129,261; WO 2007/051081; 2007/038658; 2007/059404; y 2007/089100; todas las cuales se incorporan aquí como referencia.

5 Se han descrito ligadores adicionales en las Patentes Norteamericanas 6.214.345; 2003/0096743; y 2003/0130189; de Groot *et al.*, J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot *et al.* J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot *et al.*, J. Med. Chem. 66, 8815, (2001); WO 02/083180; Carl *et al.*, J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik *et al.*, Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998), cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia.

10 Además de conectar el anticuerpo y la molécula asociada, un ligador puede impartir estabilidad a la molécula asociada, reducir su toxicidad *in vivo*, o afectar favorablemente de otra manera su farmacocinética, su disponibilidad y/o farmacodinámica. Generalmente se prefiere que el ligador esté disociado, liberando la molécula asociada, una vez que el conjugado es liberado de su sitio de acción. Asimismo, preferiblemente, los ligadores no pueden ser rastreados, debido a que una vez removidos de la molécula asociada (tal como durante la activación), no queda
15 ningún vestigio de la presencia del ligador.

En otra realización, los ligadores se caracterizan por su capacidad para ser disociados en un sitio o cerca de una célula diana tal como en el sitio de acción terapéutica o actividad marcadora de la molécula asociada. Dicha disociación puede ser de naturaleza enzimática. Esta característica ayuda a reducir la activación sistémica de la
20 molécula asociada, reduciendo la toxicidad y los efectos secundarios sistémicos. Los grupos disociables preferidos para la disociación enzimática incluyen adhesiones peptídicas, enlaces de éster y enlaces disulfuro tales como los restos F, H, y J antes mencionados. En otras realizaciones los ligadores son sensibles al pH y son disociados a través de cambios en el pH.

25 Un aspecto importante es la capacidad de controlar la velocidad con la cual se disocian los ligadores. A menudo es deseable un ligador que se disocia rápidamente. En algunas realizaciones, sin embargo, puede preferirse un ligador que se disocia más lentamente. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación con un componente de liberación rápida y una de liberación lenta, puede ser útil proveer un ligador que se disocie más lentamente. La WO 2005/112919 antes citada describe ligadores hidrazina que pueden ser diseñados para
30 disociarse en un rango de velocidades que van desde muy rápidas a muy lentas.

Los ligadores pueden servir también para estabilizar la molécula asociada contra la degradación mientras está el conjugado en circulación, es decir, antes de que llegue al tejido o célula diana. Esta característica provee un beneficio significativo debido a que prolonga la semivida de circulación de la molécula asociada. El ligador sirve
35 también para atenuar la actividad de la molécula asociada de manera que el conjugado sea relativamente benigno mientras está en circulación, pero que la molécula asociada tenga el efecto deseado—por ejemplo, que sea citotóxica—después de la activación en el sitio de acción deseado. Para conjugados de agentes terapéuticos esta característica del ligador sirve para mejorar el índice terapéutico del agente.

40 Además del péptido, hidrazina o grupos bisulfuro F, H, o J, disociables, respectivamente, se introducen opcionalmente uno o más grupos ligadores L¹ entre la molécula asociada y F, H, o J, según sea el caso. Estos grupos ligadores L¹ pueden describirse también como grupos espaciadores y contienen por lo menos dos grupos funcionales. Dependiendo del valor del suscripto m (es decir, la cantidad de grupos L¹ presentes) y la ubicación de un grupo particular L¹, una funcionalidad química de un grupo L¹ puede unirse a una funcionalidad química de la
45 molécula asociada, de F, H o J, según sea el caso, o de otro grupo ligador L¹ (si está presente más de un L¹). Ejemplos de funcionalidades químicas apropiadas para grupos espaciadores L¹ incluyen grupos hidroxilo, mercapto, carbonilo, carboxi, amino, cetona, aldehído y mercapto.

Los grupos ligadores L¹ pueden ser un grupo alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido. En una realización, los grupos alquilo o arilo pueden comprender entre 1 y 20 átomos de carbono. También pueden comprender un resto polietilenglicol.

Entre los ejemplos de grupos L¹ se incluyen por ejemplo, 6-aminohexanol, 6-mercaptohexanol, ácido 10-hidroxidecanoico, glicina y otros aminoácidos, 1,6-hexanodiol, β-alanina, 2-aminoetanol, cisteamina (2-aminoetanol), ácido 5-aminopentanoico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 3-maleimidobenzoico, ftalida, ftalidas α-sustituidas, el grupo carbonilo, ésteres aminaes, ácidos nucleicos, péptidos y similares.

Una función de los grupos L¹ es la de proveer separación espacial entre F, H o J, según sea el caso, y la molécula asociada, a menos que esta última interfiera, (por ejemplo, a través de efectos estéricos o electrónicos) con la química de disociación en F, H, o J. Los grupos L¹ pueden servir también para introducir masa molecular adicional y funcionalidad química al conjugado. Generalmente, la masa adicional y la funcionalidad afectan la vida media del suero y otras propiedades del conjugado. Por lo tanto, a través de una cuidadosa selección de los grupos espaciadores, pueden producirse conjugados con un rango de vidas medias. Opcionalmente uno o más ligadores L¹ pueden ser un grupo autoinmolativo, tal como se describió anteriormente.

65

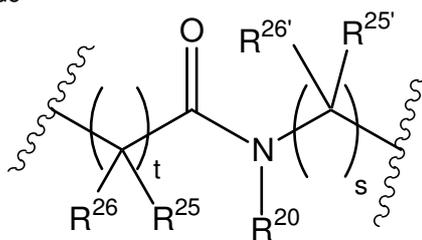
El subíndice m es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Cuando están presentes múltiplos de L^1 pueden ser iguales o diferentes.

L^4 es un resto ligador que provee separación parcial entre F, H, o J, según sea el caso, y el anticuerpo, a menos que F, H, o J interfieran con la adhesión al antígeno mediante el anticuerpo o que el anticuerpo interfiera con la química de disociación en F, H, o J. Preferiblemente, L^4 imparte propiedades de solubilidad incrementada o de agregación disminuida para los conjugados, utilizando un ligador que contiene al resto, o que modifica el régimen de hidrólisis del conjugado. Tal como en el caso de L^1 , L^4 es opcionalmente un grupo inmolativo. En una realización el residuo L^4 es alquilo sustituido, alquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroalquilo sustituido o heteroalquilo no sustituido, cualquiera de los cuales puede ser recto, ramificado o cíclico. Las sustituciones pueden ser por ejemplo, un alquilo, alcoxi, alquiltio, alquilamino o dialquilamino inferior (C_1-C_6). En ciertas realizaciones, L^4 comprende un resto no cíclico. En otras realizaciones, L^4 comprende un polímero de aminoácido cargado positiva o negativamente tal como polilisina o poliarginina. L^4 puede comprender un polímero tal como un resto polietilenglicol. Adicionalmente el ligador L^4 puede comprender por ejemplo, tanto un compuesto polimérico como un resto de molécula pequeña.

En una realización preferida, L^4 comprende un resto polietilén glicol (PEG). La porción PEG de L^4 puede estar comprendida entre 1 y 50 unidades de longitud. Preferiblemente, el PEG tendrá 1–12 unidades repetitivas, más preferiblemente 3–12 unidades repetitivas, más preferiblemente 2–6 unidades repetitivas, o incluso más preferiblemente 3–5 unidades repetitivas y más preferiblemente 4 unidades repetitivas. L^4 puede consistir únicamente del resto PEG o puede contener también un alquilo o heteroarilo adicional sustituido o no sustituido. Es útil combinar PEG como parte del resto L^4 para mejorar la solubilidad en agua del complejo. Adicionalmente, el resto PEG reduce el grado de agregación que puede ocurrir durante la conjugación del fármaco con el anticuerpo.

El subíndice p es 0 o 1; es decir, la presencia de L^4 es opcional. Cuando está presente, L^4 tiene por lo menos dos grupos funcionales, con un grupo funcional que se adhiere a una funcionalidad química en F, H, o J, según sea el caso, y el otro grupo funcional que se adhiere al anticuerpo. Ejemplos de funcionalidades químicas apropiadas de grupos L^4 incluyen hidroxilo, mercapto, carbonilo, carboxi, amino, cetona, aldehído, y mercapto. Debido a que los anticuerpos se conjugan típicamente a través de grupos sulfhidrilo (por ejemplo, a partir de residuos cisteína no oxidados, la adición de extensiones que contienen sulfhidrilo a residuos lisina con iminotiolano, o la reducción de puentes disulfuro) los grupos amino (por ejemplo residuos lisina), grupos aldehído (por ejemplo de la oxidación de cadenas secundarias glicosídicas) o grupos hidroxilo (por ejemplo de residuos serina) las funcionalidades químicas preferidas para adhesión al anticuerpo son aquellas que son reactivas con los grupos anteriores, siendo ejemplos de ellos los grupos maleimida, aldehído, hidrazina, semicarbazida, y carboxilo. Se prefiere la combinación de un grupo sulfhidrilo en el anticuerpo y un grupo maleimida en L^4 .

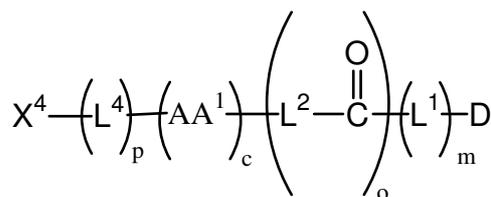
En algunas realizaciones, L^4 comprende



unido directamente al N-terminal de $(AA^1)_c$. R^{20} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y acilo. Cada R^{25} , $R^{25'}$, R^{26} , y $R^{26'}$ está seleccionado independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; y s y t son independientemente números enteros de entre 1 a 6. Preferiblemente, R^{20} , R^{25} , $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son hidrofóbicos. En algunas realizaciones, R^{20} es H o alquilo (preferiblemente, alquilo inferior no sustituido). En algunas realizaciones, R^{25} , $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son independientemente H o alquilo (preferiblemente, alquilo C^1 a C^4 no sustituido). En algunas realizaciones, R^{25} , $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son todos H. En algunas realizaciones t es 1 y s es 1 o 2.

Ligadores Peptídicos (F)

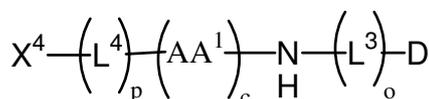
Tal como se discutió anteriormente, los ligadores peptídico de la invención pueden representarse por la fórmula general: $(L^4)_p-F-(L^1)_m$, donde F representa la porción que comprende el resto peptídico. En una realización la porción F comprende un ligador L^2 opcional adicional autoinmolativo y un grupo carbonilo que corresponden a un conjugado de la fórmula:



En esta realización, L^1 , L^4 , p , y m son tal como se han definido anteriormente. X^4 es un anticuerpo y D es una molécula asociada. El suscripto o es 0 o 1 y L^2 , si está presente, representa un ligador auto-inmolativo. AA^1 representa uno o más aminoácidos naturales y/o α -aminoácidos no naturales; c es un número entero de 1 y 20. En algunas realizaciones, c está en el rango de 2 a 5 o c es 2 o 3.

En la fórmula (a), AA^1 está ligado, a su amino terminal, ya sea directamente a L^4 o, cuando L^4 está ausente, directamente a X^4 . En algunas realizaciones cuando L^4 está presente, L^4 no comprende un grupo de acilo carboxílico unido directamente al N-terminal de $(AA^1)_c$.

En otra realización, la porción F comprende un grupo amino y un grupo espaciador opcional L^3 y L^1 está ausente (es decir, m es 0), que corresponde a un conjugado de la fórmula (b):

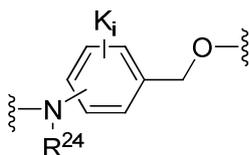


En esta realización, X^4 , D , L^4 , AA^1 , c , y p son tal como se han definido anteriormente. El suscripto o es 0 o 1. L^3 , si está presente, es un grupo espaciador que comprende una amina primaria o secundaria o un grupo funcional carboxilo, y o bien la amina de L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional carboxilo pendiente de D o el carboxilo de L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional amina pendiente de D .

Ligadores Auto-Inmolativos

Un ligador auto-inmolativo es un residuo químico bifuncional que es capaz de ligarse covalentemente conjuntamente a dos restos químicos espaciados, en una molécula tripartita normalmente estable, liberando uno de dichos restos químicos espaciados desde la molécula tripartita por medio de disociación enzimática; y a continuación de esta disociación enzimática, se disocia espontáneamente del remanente de la molécula para liberar al otro de dichos restos químicos espaciados. De acuerdo con la presente invención, el espaciador auto-inmolativo está ligado covalentemente a uno de sus extremos con el resto peptídico y está ligado covalentemente en su otro extremo con el sitio químicamente reactivo del resto fármaco cuya derivatización inhibe la actividad farmacológica, de modo de espaciar y ligar covalentemente conjuntamente el resto peptídico y el resto fármaco en una molécula tripartita que es estable y que es farmacológicamente inactiva en ausencia de la enzima diana pero que es enzimáticamente disociable por dicha enzima diana en el enlace que liga covalentemente el resto espaciador y el resto peptídico para efectuar de esta manera la liberación del resto peptídico desde la molécula tripartita. Dicha disociación enzimática, a su vez, activará el carácter auto-inmolativo del resto espaciador e iniciará la disociación espontánea del enlace que está ligado covalentemente al resto espaciador con el resto fármaco, para efectuar de este modo la liberación del fármaco en forma farmacológicamente activa. Ver por ejemplo, Carl *et al.*, J. Med. Chem., 24 (3), 479-480 (1981); Carl *et al.*, WO 81/01145 (1981); Toki *et al.*, J. Org. Chem. 67, 1866-1872 (2002); Boyd *et al.*, WO 2005/112919; Boyd *et al.*, WO 2007/038658, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia.

Un espaciador auto-inmolativo particularmente preferido puede representarse por la fórmula (c):

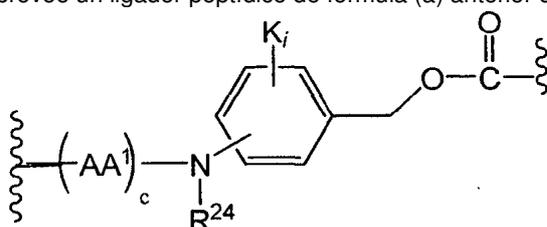


El anillo aromático del grupo amino bencilo puede estar sustituido con uno o más grupos "K". Un grupo "K" es un sustituyente en el anillo aromático que reemplaza un hidrógeno por otra parte unido a uno de los cuatro carbonos no sustituidos que forman parte de la estructura de anillo. El grupo "K" puede ser un átomo único tal como un halógeno, o puede ser un grupo de multiátomos tales como alquilo, heteroalquilo, amino, nitro, hidroxilo, alcoxi, haloalquilo, y ciano. Cada K está seleccionada independientemente del grupo que consiste en alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO_2 ,

- 5 $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $OCOR^{21}$, OR^{21} , y OR^{21} , donde R^{21} y R^{22} están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido. Ejemplos de sustituyentes K incluyen, pero no están limitados a, F, Cl, Br, I, NO_2 , OH, OCH_3 , $NHCOCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHCOCF_3$ y metilo. Para " K_i ", i es un número entero de 0, 1, 2, 3, o 4. En una realización preferida, i es 0.

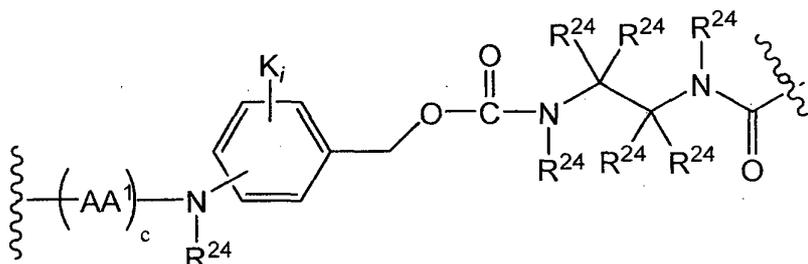
10 El átomo de oxígeno de éter de la estructura que se muestra anteriormente está conectado a un grupo carbonilo. La línea de funcionalidad de NR^{24} en el anillo aromático indica que la funcionalidad amina puede estar ligada a cualquiera de los cinco átomos que forman el anillo y no están sustituidos con el grupo $-CH_2-O-$. Preferiblemente, la funcionalidad NR^{24} de X está ligada covalentemente al anillo aromático en la posición para en relación al grupo $-CH_2-O-$. R^{24} es un miembro seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido. En una realización específica R^{24} es hidrógeno.

- 15 En una realización, la invención provee un ligador peptídico de fórmula (a) anterior donde F comprende la estructura:



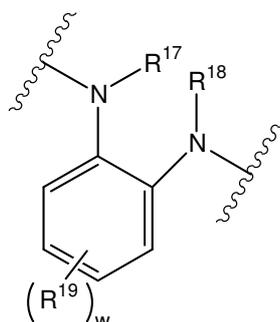
donde R^{24} , AA^1 , K, i , y c son tal como han sido definidos anteriormente.

- 20 En otra realización, el ligador peptídico de la fórmula (a) anterior comprende un $-F-(L^1)_m-$ que comprende la estructura:



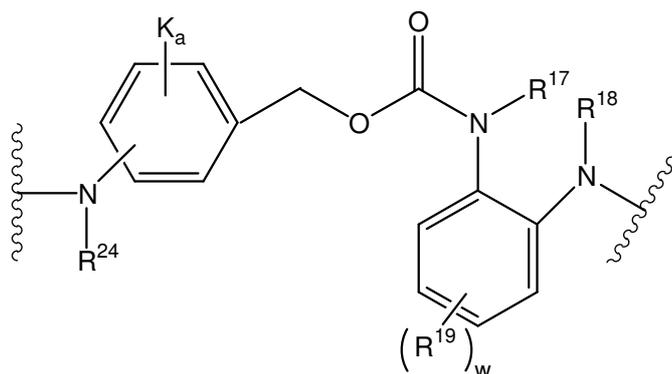
donde R^{24} , AA^1 , K, i , y c son tal como se han definido anteriormente.

- 25 En algunas realizaciones, el espaciador auto-inmolutivo L^1 o L^2 incluye



- 30 en la cual cada R^{17} , R^{18} , y R^{19} está seleccionado independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido, y w es un número entero de 0 a 4. En algunas realizaciones, R^{17} y R^{18} son independientemente H o alquilo (preferiblemente, alquilo C_1-C_4 no sustituido). Preferiblemente, R^{17} y R^{18} son alquilo C_1-4 , tales como metilo o etilo. En algunas realizaciones w es 0. Se ha descubierto experimentalmente que este espaciador auto-inmolutivo particular cicla en forma relativamente rápida.

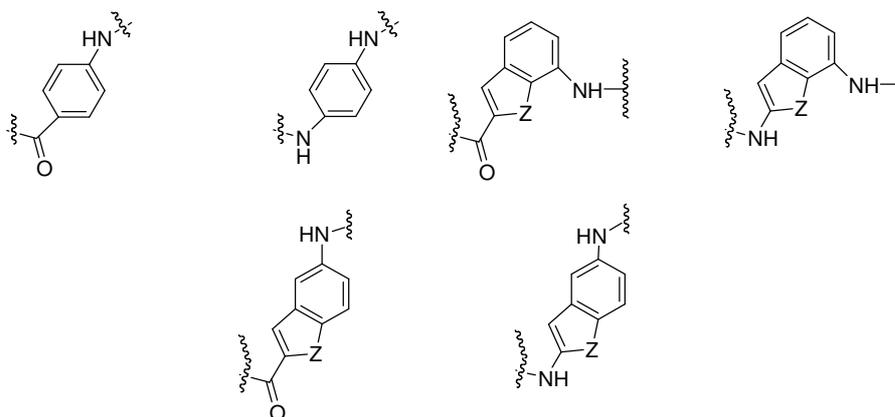
- 35 En algunas realizaciones, L^1 o L^2 incluye



en la cual R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{24} , y K son tal como se ha definido anteriormente.

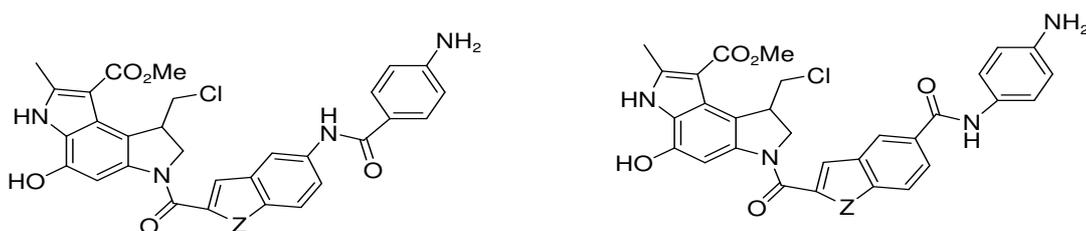
5 Grupos Espaciadores

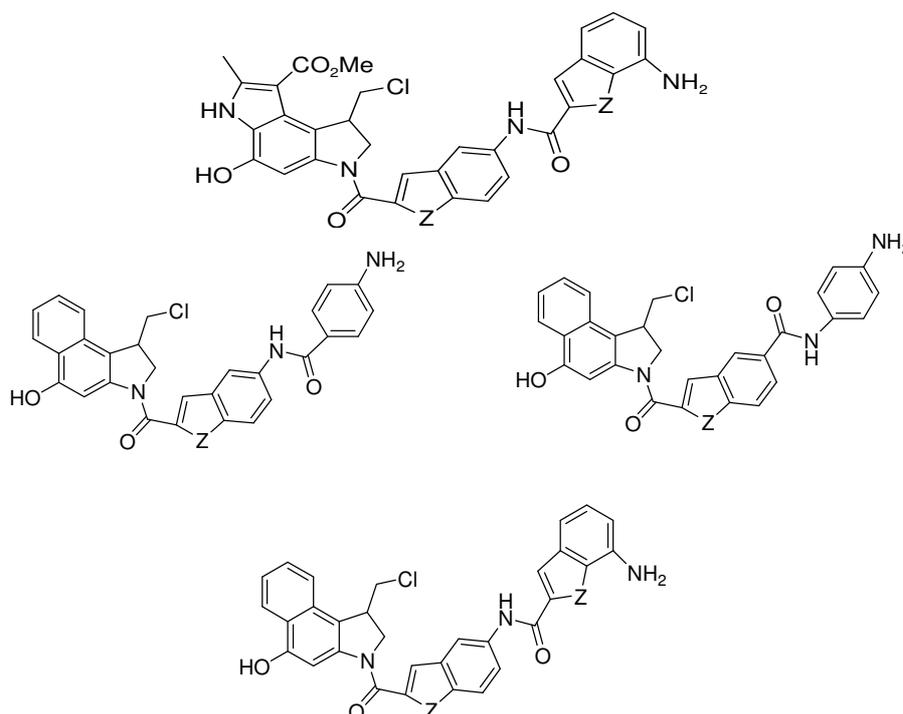
El grupo espaciador L^3 se caracteriza porque comprende una amina primaria o secundaria o un grupo funcional carboxilo, y o bien la amina del grupo L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional carboxilo pendiente de D o el carboxilo de L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional amina pendiente de D. L^3 puede seleccionarse del grupo que consiste en alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. En una realización preferida, L^3 comprende un grupo aromático. Más preferiblemente L^3 comprende un grupo de ácido benzoico, un grupo anilina o un grupo indol. Ejemplos no limitativos de estructuras que pueden servir como espaciador $-L^3-NH-$ incluyen las estructuras siguientes:



donde Z es un miembro seleccionado entre O, S y NR^{23} , y donde R^{23} es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo.

Mediante disociación del ligador de la invención que contiene L^3 , el resto L^3 permanece unido al fármaco D. Por consiguiente, el resto L^3 se elige de manera que su unión con D no altere significativamente la actividad de D. En otra realización, una porción del fármaco D funciona por sí mismo como espaciador L^3 . Por ejemplo, en una realización, el fármaco D, es un derivado duocarmicina en el cual una porción del fármaco funciona como espaciador L^3 . Ejemplos no limitativos de dichas realizaciones incluyen aquellos en los cuales $NH_2-(L^3)-D$ tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:





y

5

donde Z es O, S o NR²³, donde R²³ es H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, o acilo; y el grupo NH₂ en cada estructura reacciona con (AA¹)_c para formar -(AA¹)_c-NH-.

Secuencia Peptídica (AA¹)_c

10

El grupo AA¹ representa un aminoácido único o una pluralidad de aminoácidos que están unidos conjuntamente por enlaces amida. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales y/o α-aminoácidos no naturales. Pueden estar en la configuración L o D. En una realización, se usan por lo menos tres aminoácidos diferentes. En otra realización, se usan únicamente dos aminoácidos.

15

20

25

30

35

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como también análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a la de los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como también aquellos aminoácidos que han sido posteriormente modificados, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, citrulina, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que el aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, no leucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que el aminoácido natural. Un aminoácido que puede usarse en particular es la citrulina que es un precursor de la arginina y que está involucrado en la formación de urea en el hígado. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar al aminoácido natural. El término "aminoácido no natural" representa la forma estereoquímica "D" de los veinte aminoácidos naturales descritos anteriormente. Se comprenderá además que el término aminoácido no natural incluye los homólogos de los aminoácidos naturales, y las formas modificadas sintéticamente de los aminoácidos naturales. Las formas modificadas sintéticamente incluyen pero no están limitadas a aminoácidos que tienen cadenas alquilenas acortadas o alargadas con hasta dos átomos de carbono, aminoácidos que comprenden grupos arilo opcionalmente sustituidos y aminoácidos que comprenden grupos halogenados preferiblemente grupos alquilo y arilo halogenados. Cuando se une a un ligador o conjugado de la invención el aminoácido está en forma de una cadena secundaria de aminoácido" donde el grupo ácido carboxílico del aminoácido ha sido reemplazado con un grupo ceto (C(O)). Por lo tanto, por ejemplo, una cadena secundaria alanina es -C(O)-CH(NH₂)-CH₃, etc.

40

La secuencia peptídica (AA¹)_c es funcionalmente el residuo de amidificación de un aminoácido único (cuando c=1) o una pluralidad de aminoácidos unidos conjuntamente con enlaces amida. La secuencia peptídica (AA¹)_c está seleccionada preferiblemente para disociación catalizada por enzima mediante una enzima en un lugar de interés en un sistema biológico. Por ejemplo, para conjugados que son dianas de pero no están internalizados por una célula, se elige un péptido que es disociado por una proteasa que está en una matriz extracelular, por ejemplo, una proteasa liberada por células casi moribundas o una proteasa asociada a un tumor, de manera que el péptido es

disociado extracelularmente. Para conjugados que han sido designados para internalización por una célula (AA¹)_c está preferiblemente seleccionada para disociación por medio de una proteasa endosomal o lisosomal. La cantidad de aminoácidos dentro del péptido puede estar dentro de un rango de 1 a 20; pero más preferiblemente será de 1–8 aminoácidos, 1–6 aminoácidos o 1, 2, 3 o 4 aminoácidos que comprende (AA¹)_c. Las secuencias peptídicas que son susceptibles de disociación mediante enzimas o clases de enzimas específicas con bien conocidas en la materia.

Preferiblemente, (AA¹)_c contiene una secuencia de aminoácidos (“secuencia de reconocimiento de disociación”) que es un sitio disociable mediante la proteasa. Se conocen en la técnica muchas secuencias de disociación de proteasa. Ver por ejemplo, Matayoshi *et al. Science* 247: 954 (1990); Dunn *et al. Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah *et al. Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber *et al. Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith *et al. Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); Bouvier *et al. Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995), Hardy *et al.*, en *Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, and Alzheimer’s Disease*, ed. Masters *et al.* pp. 190–198 (1994).

En una realización preferida, la secuencia peptídica (AA¹)_c se elige basándose en su capacidad para ser disociada por proteasas lisosomales, ejemplos limitativos de las cuales incluyen catepsinas B, C, D, H, L y S. Preferiblemente, la secuencia peptídica (AA¹)_c es capaz de ser disociada con catepsina B *in vitro*.

En otra realización, la secuencia peptídica (AA¹)_c se elige basándose en su capacidad para ser disociada con una proteasa asociada a un tumor, tal como una proteasa que se encuentra extracelularmente en la vecindad de células tumorales, ejemplos, de las cuales incluyen (TOP) y CD10. En otras realizaciones, la secuencia (AA¹)_c está diseñada para disociación selectiva con uroquinasa o triptasa.

Ejemplos apropiados, pero no limitativos, de secuencias peptídicas apropiadas para ser usadas en los conjugados de la invención incluyen Val-Cit, Cit-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N9-tosyl-Arg, Phe-N9-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ. ID NO: 40), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ. ID NO: 41) y Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ. ID NO: 42) Val-Ala, Leu-Leu-Gly-Leu (SEQ. ID NO: 43), Leu-Asn-Ala, and Lys-Leu-Val. Secuencias de péptidos preferidas son Val-Cit y Val-Lys.

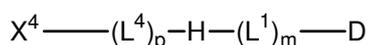
En otra realización, el aminoácido más próximo al resto fármaco está seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Asp, Cit, Cis, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Fe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tir, y Val. En otra realización más, el aminoácido situado más próximo al resto fármaco está seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Asp, Cis, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Fe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tir, y Val.

Un experto en la materia puede evaluar rápidamente una disposición de secuencias peptídicas para determinar su utilidad en la presente invención sin recurrir a experimentaciones exageradas. Ver por ejemplo, Zimmerman, M., *et al.*, (1977) *Analytical Biochemistry* 78:47–51; Lee, D., *et al.*, (1999) *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters* 9:1667–72; y Rano, T.A., *et al.*, (1997) *Chemistry y Biology* 4:149–55.

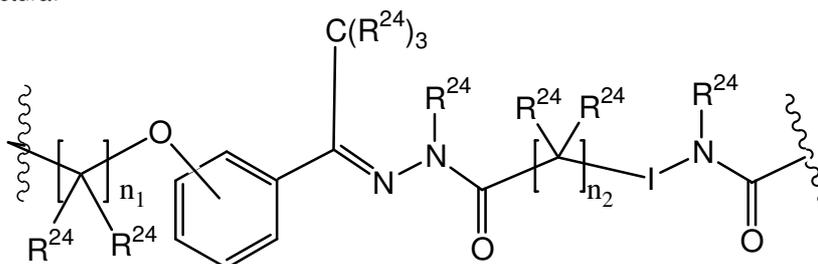
Un conjugado de esta invención puede contener opcionalmente dos o más ligadores. Estos ligadores pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, puede usarse un ligador peptídico para conectar el fármaco con el ligando y un segundo ligador peptídico puede unirse a un agente de diagnóstico para el complejo. Otros usos para ligadores adicionales incluyen ligar agentes analíticos, biomoléculas, agentes de guía a la diana, y rótulos detectables para el complejo anticuerpo – asociado.

Ligadores Hidrazina (H)

En otra realización, el conjugado de la invención comprende un ligador hidrazina auto-inmolativo donde el conjugado tiene la estructura:

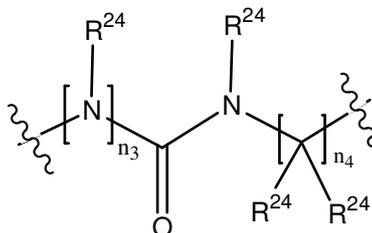


en la cual D, L¹, L⁴, p, m, y X⁴ son tal como se han definido anteriormente y descrito aquí, y H es un ligador que comprende la estructura:



55

en la cual n_1 es un número entero de 1 – 10; n_2 es 0, 1, o 2; cada R^{24} es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido y heteroalquilo no sustituido; y l es un enlace (es decir, el enlace entre el carbono del esqueleto y el nitrógeno adyacente) o:



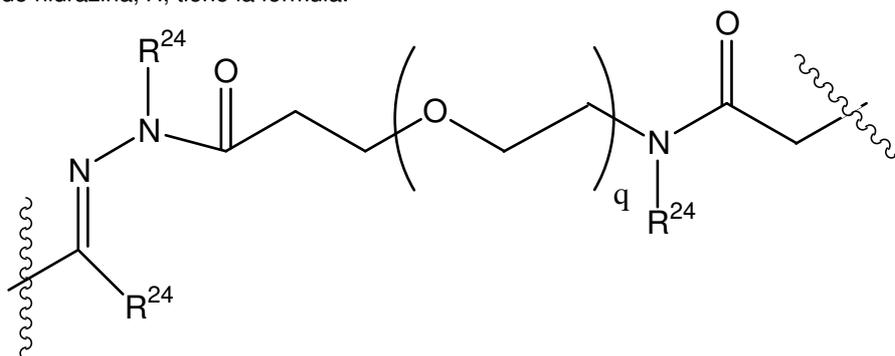
5

en la cual n_3 es 0 o 1, con la condición de que cuando n_3 es 0 n_2 no sea 0; y n_4 es 1, 2, o 3.

En una realización, la sustitución del anillo fenilo es una sustitución para. En realizaciones preferidas, n_1 es 2, 3, o 4 o n_1 es 3. En realizaciones preferidas n_2 es 1. En realizaciones preferidas, l es un enlace (es decir el enlace entre el carbono del esqueleto y el nitrógeno adyacente). En un aspecto, el ligador hidrazina H puede formar un ligador autoinmolativo de seis miembros por disociación, por ejemplo, cuando n_3 es 0 y n_4 es 2. En otro aspecto, el ligador hidrazina H, puede formar dos ligadores autoinmolativos de 5 miembros por disociación. En otros aspectos, H, forma un ligador autoinmolativo de 5 miembros, H forma un ligador auto-inmolativo de 7 miembros, o H forma un ligador autoinmolativo de 5 miembros y un ligador autoinmolativo de 6 miembros por disociación. El régimen de disociación está afectado por el tamaño del anillo formado al disociarse. Por lo tanto, dependiendo del régimen de disociación deseado, puede seleccionarse un anillo del tamaño apropiado en la disociación.

15

Otra estructura de hidrazina, H, tiene la fórmula:



20

donde q es 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6; y cada R^{24} es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido y heteroalquilo no sustituido. Esta estructura hidrazina puede formar también anillos de cinco, seis o siete miembros y pueden agregarse componentes adicionales para formar anillos múltiples.

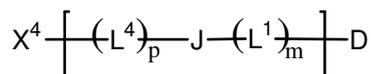
25

La preparación, química de disociación y cinética de ciclación de los varios ligadores hidrazina se describen en la WO 2005/112919, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

Ligadores Disulfuro (J)

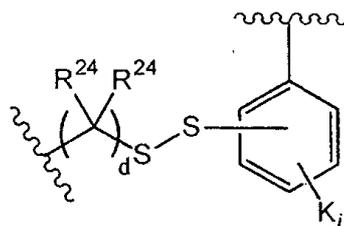
30

En otra realización, el ligador comprende un grupo disulfuro enzimáticamente disociable. En una realización, la invención provee un compuesto citotóxico asociado a anticuerpo que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (d):



35

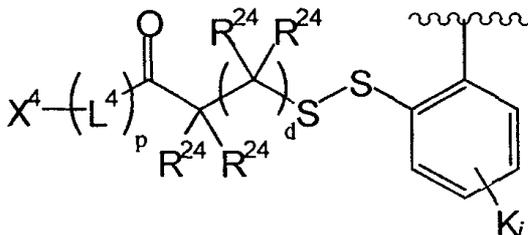
en la cual D, L^1 , L^4 , p, m, y X^4 son tal como se han definido anteriormente y descrito en forma más detallada aquí y J es un ligador disulfuro que comprende un grupo que tiene la estructura:



5 en la cual cada R^{24} es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido y heteroalquilo no sustituido; cada K es un miembro
 10 independientemente seleccionado del grupo que consiste en alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO_2 , $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $CONR^{21}R^{22}$, $OCOR^{21}$, y OR^{21} , donde R^{21} y R^{22} están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido; i es un número entero de 0, 1, 2, 3, o 4; y d es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

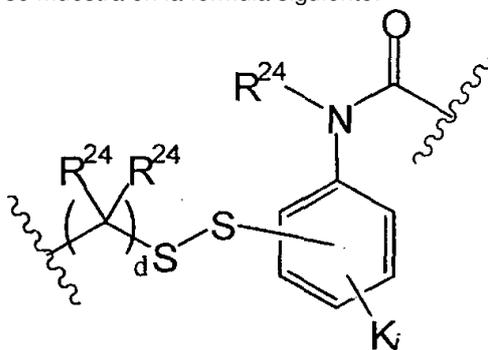
15 El anillo aromático de un ligador disulfuro puede estar sustituido con uno o más grupos "K" Un grupo "K" es un sustituyente en el anillo aromático que reemplaza un hidrógeno que está por otra parte unido a uno de los cuatro carbonos no sustituidos, que forman parte de la estructura de anillo. El grupo "K" puede ser un átomo único tal como un halógeno o puede ser un grupo de multiátomos tales como alquilo, heteroalquilo, amino, nitro, hidroxil, alcoxi, haloalquilo, y ciano. Ejemplos de sustituyentes K incluyen independientemente, pero no están limitados a, F, Cl, Br, I, NO_2 , OH, OCH_3 , $NHCOCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHCOCF_3$ y metilo. Para "K", i es un número entero de 0, 1, 2, 3, o 4. En una realización específica i es 0.

20 En una realización preferida, el ligador comprende un grupo disulfuro enzimáticamente dissociable de la fórmula siguiente:



25 en la cual L^4 , X^4 , p , y R^{24} son tal como se han descrito anteriormente y d es 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En una realización particular, d es 1 o 2.

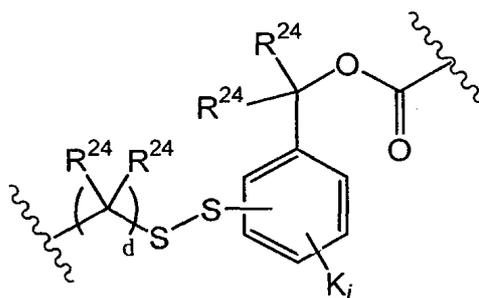
Un ligador disulfuro más específico se muestra en la fórmula siguiente:



30

Preferiblemente, d es 1 o 2 y cada K es H.

Otro ligador disulfuro se muestra en la fórmula siguiente:



Preferiblemente, d es 1 o 2 y cada K es H.

5 En varias realizaciones, los disulfuros son orto para la amina. En otra realización específica a es 0. En realizaciones preferidas R^{24} está seleccionado independientemente entre H y CH_3 .

10 La preparación química de los ligadores disulfuro tales como los descritos anteriormente se describe en WO 2005/112919, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

Para una consideración adicional con respecto a los tipos de citotoxinas, ligadores y otros métodos para conjugar agentes terapéuticos para los antibióticos, ver también 7.087.600; Patente Norteamericana 6.989.452; Patente Norteamericana 7.129.261; Patente Norteamericana 2006/0004081; Patente Norteamericana 2006/0247295; WO 15 02/096910; WO 2007/051081; WO 2005/112919; WO 2007/059404; WO 2008/083312; Solicitud PCT No. PCT/US2008/054362; Saito *et al.* (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199–215; Trail *et al.* (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328–337; Payne. (2003) Cancer Cell 3:207–212; Allen (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750–763; Pastan y Kreitman (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089–1091; Senter y Springer (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247–264, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

20

Citotoxinas como Moléculas Asociadas

En un aspecto, la presente invención caracteriza un anticuerpo conjugado a una molécula asociada tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados se denominan también "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, las mata).

Ejemplos de moléculas asociadas de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, 30 dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1–deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Ejemplos de moléculas asociadas incluyen también por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6–mercaptopurina, 6–tioguanina, citarabina, 5–flururacil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, tubulisina, 35 dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, cisplatina, antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti–mitóticos (e.g., vincristina y vinblastina). Otros ejemplos preferidos de moléculas asociadas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen caliqueminas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas.

40

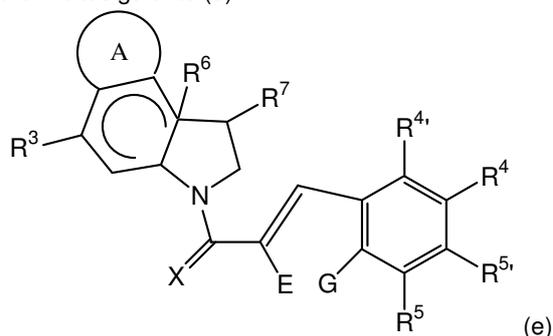
Son ejemplos preferidos de moléculas asociadas, los análogos y derivados de CC–1065 y las duocarmicinas estructuralmente relacionadas. A pesar de su potente y amplia actividad anti–tumoral, las CC–1065 no pueden usarse en seres humanos debido a que causan muerte retardada en animales experimentales, impulsando una búsqueda o análogos o derivados con un índice terapéutico mejor.

45

Muchos análogos y derivados de CC–1065 y las duocarmicinas son conocidos en la materia. La investigación de la estructura, síntesis y propiedades de muchos de los compuestos ha sido revisada. Ver por ejemplo, Boger *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996); y Boger *et al.*, Chem. Rev. 97: 787 (1997). Otras discusiones relacionadas con análogos CC–1065 o derivados incluyen Patente Norteamericana 5.101.038; Patente Norteamericana 5.641.780; Patente Norteamericana 5.187.186; Patente Norteamericana 5.070.092; Patente Norteamericana 5.703.080; Patente Norteamericana 5.070.092; Patente Norteamericana 5.641.780; Patente Norteamericana 5.101.038; Patente Norteamericana 5.084.468; Patente Norteamericana 5.739.350; Patente Norteamericana 4.978.757. Patente Norteamericana 5.332. 837 y Patente Norteamericana 4.912.227; WO 96/10405; y EP 0.537.575 A1

55

En un aspecto particularmente preferido, la molécula asociada es un análogo de CC-1065/duocarmicina que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula siguiente (e):



5 en la cual el sistema de anillo A es un miembro seleccionado entre grupos arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. Ejemplos de sistemas de anillo A incluyen fenilo y pirrol.

10 Los símbolos E y G están seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, un heteroátomo, un enlace único o E y G están unidos opcionalmente para formar un sistema de anillo seleccionado entre arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

15 El símbolo X representa un miembro seleccionado entre O, S y NR²³. R²³ es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo.

20 El símbolo R³ representa un miembro seleccionado entre (=O), SR¹¹, NHR¹¹ y OR¹¹, en el cual R¹¹ es H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos, sulfonatos, acilo, C(O)R¹² R¹³, C(O)OR¹², C(O)NR¹²R¹³, P(O)(OR¹²)₂, C(O)CHR¹²R¹³, SR¹² o SiR¹²R¹³R¹⁴. Los símbolos R¹², R¹³, y R¹⁴ representan independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y arilo sustituido o no sustituido, donde R¹² y R¹³ conjuntamente con el átomo de nitrógeno o carbono al cual están adheridos, se unen opcionalmente para formar un sistema de anillo heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de cuatro a seis miembros, que contiene opcionalmente dos o más heteroátomos.

25 R⁴, R^{4'}, R⁵ y R^{5'} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, NO₂, NR¹⁵R¹⁶, NC(O)R¹⁵, OC(O)NR¹⁵R¹⁶, OC(O)OR¹⁵, C(O)R¹⁵, SR¹⁵, OR¹⁵, CR¹⁵=NR¹⁶, y O(CH₂)_nN(CH₃)₂, donde m es un número entero de 1 a 20 o cualquier par adyacente de R⁴, R^{4'}, R⁵ y R^{5'}, conjuntamente con los átomos de carbono a los cuales están adheridos, se unen para formar un anillo cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de cuatro a seis miembros. R¹⁵ y R¹⁶ representan independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, y peptídilo sustituido o no sustituido, donde R¹⁵ y R¹⁶ conjuntamente con el átomo de nitrógeno al cual están adheridos se unen opcionalmente para formar un sistema de anillo heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros que contienen opcionalmente dos o más heteroátomos. Un ejemplo de estructura es la anilina.

30

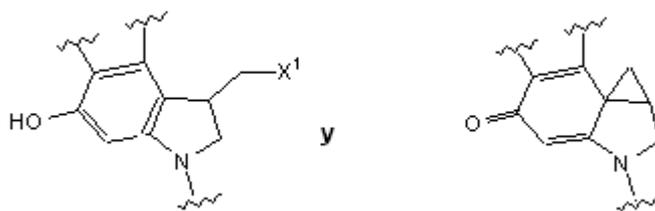
35

Uno de R³, R⁴, R^{4'}, R⁵, y R^{5'} une la citotoxina con un ligador o sustrato disociable de enzima de la presente invención tal como se describió aquí, por ejemplo, a L¹ o L³, si está presente o a F, H, o J.

40 R⁶ es un enlace único que está presente o bien ausente. Cuando R⁶ está presente, R⁶ y R⁷ se unen para formar un anillo ciclopropilo. R⁷ es CH₂-X¹ o -CH₂-. Cuando R⁷ es -CH₂- es un componente del anillo ciclopropano. El símbolo X¹ representa un grupo saliente tal como un halógeno, por ejemplo, Cl, Br o F. Las combinaciones de R⁶ y R⁷ se interpretan en una manera que no viola los principios de valencia química.

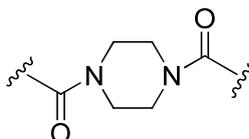
45 X¹ puede ser cualquier grupo saliente. Grupos salientes útiles incluyen pero no están limitados a halógenos, azidas, ésteres sulfónicos (por ejemplo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo), iones de oxonio, percloratos de alquilo, ésteres de alcansulfonato de amonio, fluorsulfonatos de alquilo y compuestos fluorados (por ejemplo, triflatos, nonaflatos, tresilatos) y similares. Halógenos particulares útiles como grupos salientes son F, Cl y Br.

50 La línea curva dentro del anillo de seis miembros indica que el anillo puede tener uno o más grados de insaturación y puede ser aromático. Por lo tanto estructuras de anillo tales como las que se indican a continuación y estructuras relacionadas están dentro del alcance de la fórmula (f):

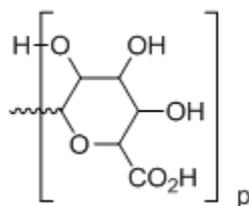
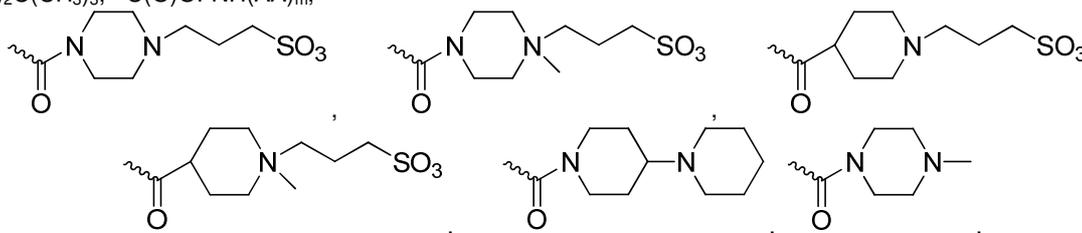


(f).

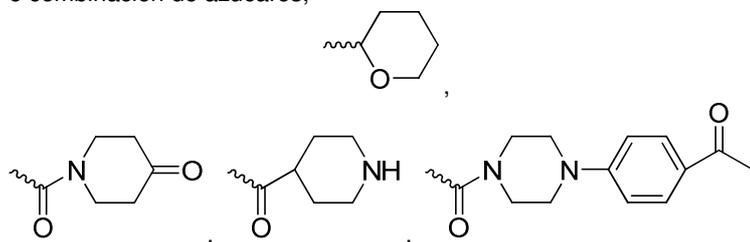
5 En una realización, R^{11} incluye un resto, X^5 , que no se auto-cicla y que liga el fármaco a L^1 o L^3 , si está presente, o a F, H, o J. El resto X^5 , es preferiblemente dissociable usando una enzima y cuando está dissociado provee el fármaco activo. Como ejemplo R^{11} puede tener la estructura siguiente (con el acoplamiento del lado derecho a lo que queda del fármaco):



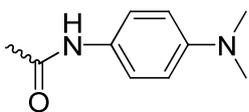
10 En algunas realizaciones, por lo menos uno de R^4 , R^4 , R^5 , y R^5 , una dicho fármaco a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 , y R^3 está seleccionado entre SR^{11} , NHR^{11} y OR^{11} . R^{11} está seleccionado entre $-SO(OH)_2$, $-PO(OH)_2$, $-AA_n$, $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$, $-C(O)OFNH(AA)_m$,



15 o cualquier otro azúcar o combinación de azúcares,



20 y

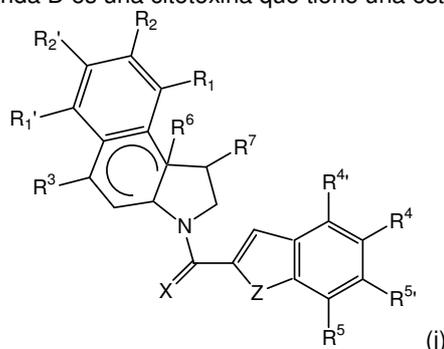


25 y las sales de los mismos farmacéuticamente aceptables donde n es cualquier número entero en el rango de 1 a 10, m es cualquier número entero en el rango de 1 a 4, p es cualquier número entero en el rango de de 1 a 6, y AA es cualquier aminoácido natural o no natural. Cuando el compuesto de fórmula (e) se conjuga a través de R^4 , R^4 , R^5 , o R^6 , R^3 comprende preferiblemente un grupo bloqueador dissociable cuya presencia bloquea la actividad citotóxica del compuesto, pero es dissociable bajo las condiciones que se encuentran en el sitio de acción propuesto mediante un mecanismo diferente del de la disociación del ligador que conjuga la citotoxina con el anticuerpo. De esta manera, si

hay disociación accidental del conjugado en el plasma, el grupo bloqueador atenúa la citotoxicidad de la citotoxina liberada. Por ejemplo, si el conjugado tiene una hidrazona o ligador disulfuro el grupo bloqueador puede ser una amida enzimáticamente disociable. O si el ligador es un peptidilo disociable por una proteasa, el grupo bloqueador puede ser un éster o un carbamato disociable por una carboxiesterasa.

5

Por ejemplo, en una realización preferida D es una citotoxina que tiene una estructura (j):



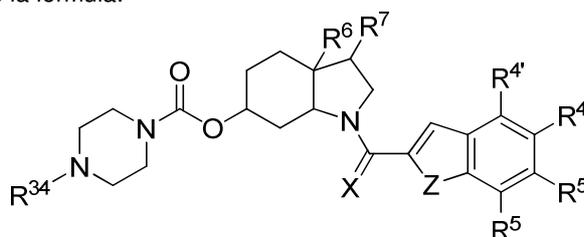
10 En esta estructura, R^3 , R^6 , R^7 , R^4 , R^4' , R^5 , R^5' y X son tal como se han descrito anteriormente para la fórmula (e). Z es un miembro seleccionado entre O, S y NR^{23} , donde R^{23} es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo.

15 R^1 es H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquilo inferior sustituido o no sustituido, $C(O)R^8$, o CO_2R^8 , donde R^8 es un miembro seleccionado entre NR^9R^{10} y OR^9 , en el cual R^9 y R^{10} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

20 R^1 es H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, o $C(O)R^8$, donde R^8 es un miembro seleccionado entre NR^9R^{10} y OR^9 , en el que R^9 y R^{10} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

R^2 es H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, o heteroalquilo no sustituido o ciano o alcoxi; y $R^{2'}$ es H, o alquilo inferior sustituido o no sustituido o heteroalquilo no sustituido.

25 Uno de R^3 , R^4 , R^4' , R^5 , o R^5' liga la citotoxina a L^1 o L^3 , si está presente, o a F, H, o. Otra realización adicional tiene la fórmula:



30 En esta estructura, A, R^6 , R^7 , X, R^4 , R^4' , R^5 , y R^5' son tal como se han descrito anteriormente para la Fórmula (e). Z es un miembro seleccionado entre O, S y NR^{23} , donde R^{23} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo;

35 R^{34} es $C(=O)R^{33}$ o alquilo C_1-C_6 , donde R^{33} está seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $CR^{15}=NR^{16}$, y $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, donde n es un número entero de 1 a 20. R^{15} y R^{16} representan independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, y peptidilo sustituido o no sustituido, donde R^{15} y R^{16} conjuntamente con el átomo de nitrógeno al cual están adheridos se unen opcionalmente para formar un sistema de anillo heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros, que contienen opcionalmente dos o más heteroátomos.

40 Preferiblemente, A es fenilo sustituido o no sustituido, o pirrol sustituido o no sustituido. Además, cualquier selección de sustituyentes descritos aquí para R^{11} es también aplicable a R^{33} .

45 Marcadores como Moléculas Asociadas

Cuando la molécula asociada es un marcador, puede ser cualquier resto que tenga o que genere una propiedad

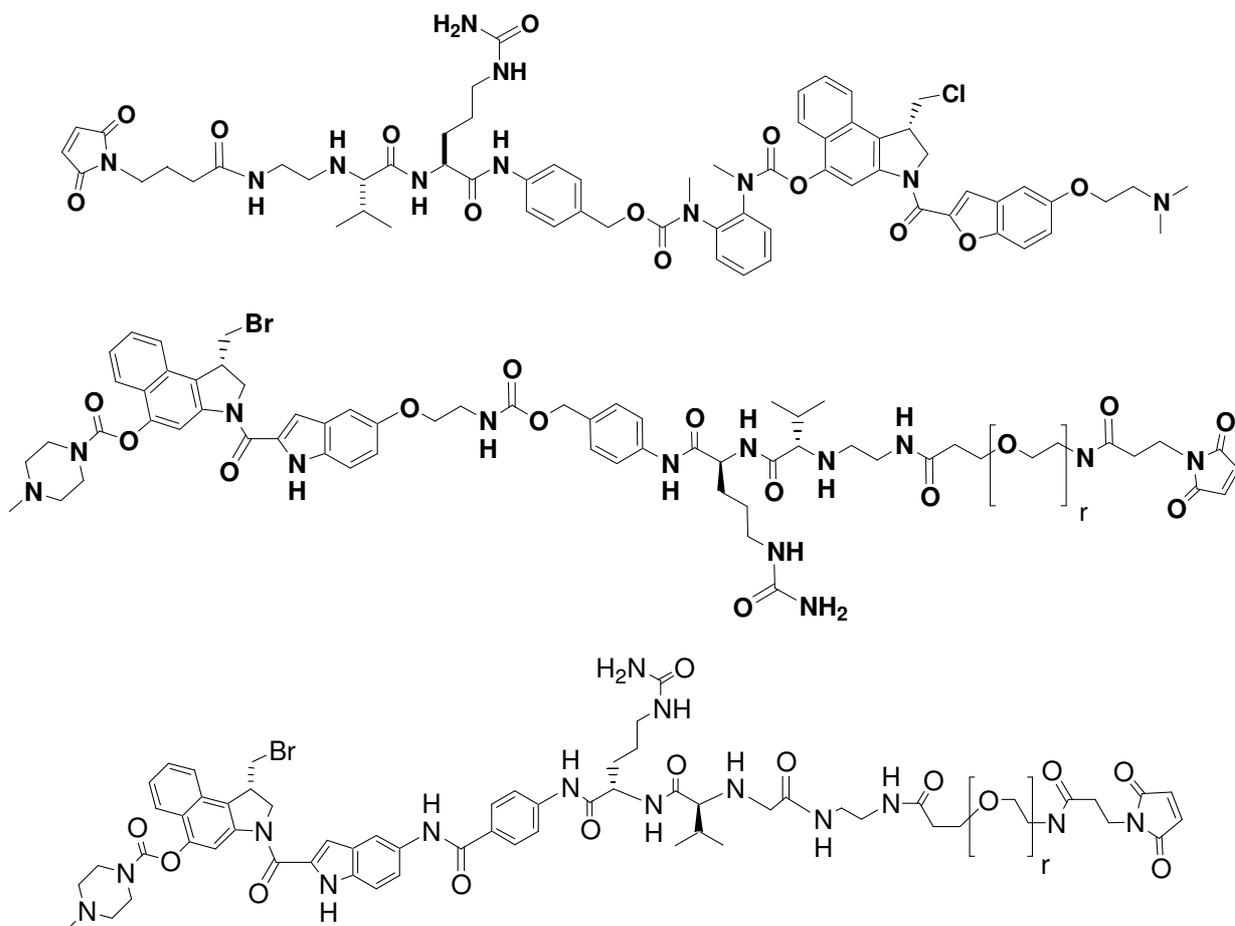
física o química detectable, indicando de este modo su presencia en un tejido o célula particular. Los marcadores (denominados también algunas veces grupos informantes) han sido bien desarrollados en el área de los inmunoensayos, investigaciones biomédicas y diagnósticos médicos. Un marcador puede detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Entre los ejemplos se incluyen granulados magnéticos (por ejemplo, DYNABEADS™), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radiorótulos (por ejemplo., ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros que se usan comúnmente en un ELISA), y rótulos colorimétricos tales como granulados de plástico o vidrio coloreados o dorados coloidales (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc).

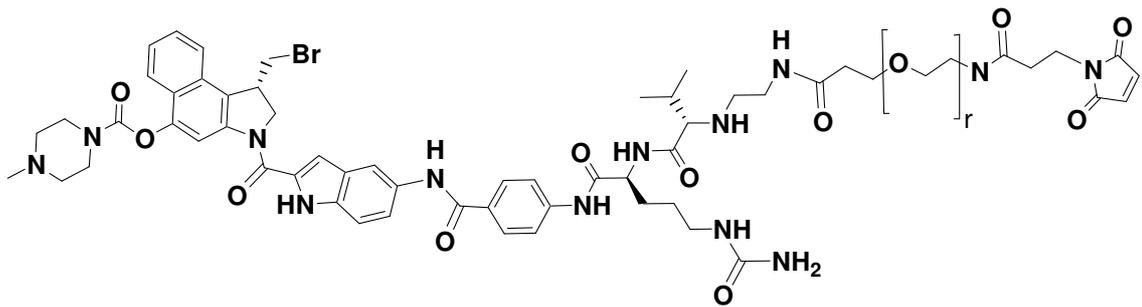
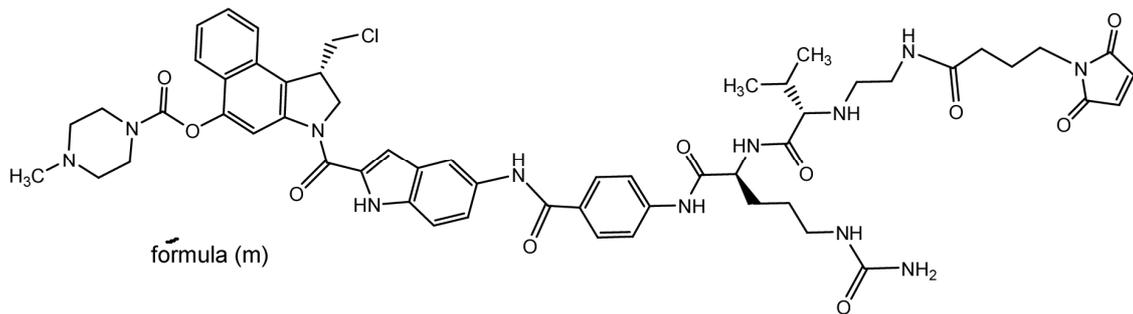
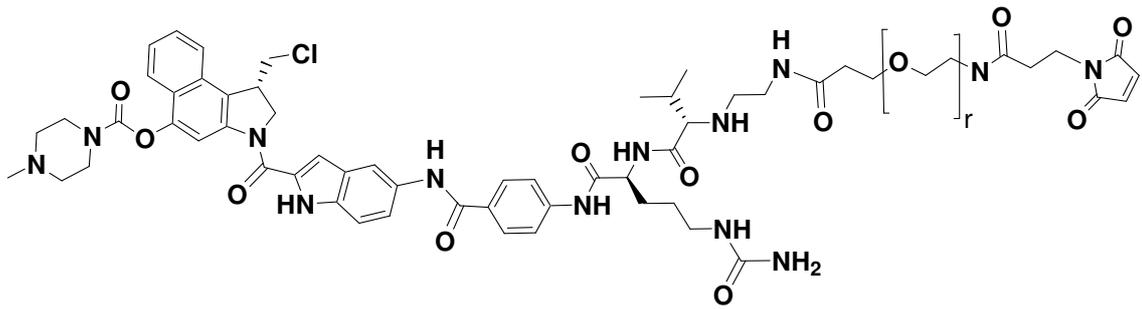
El marcador es preferiblemente un miembro seleccionado del grupo que consiste en isotopos radioactivos, agentes fluorescentes, precursores de agentes fluorescentes, cromoforos, enzimas y combinaciones de éstos. Ejemplos de enzimas apropiadas son peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa y glucosa oxidasa. Agentes fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalazindionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de varios sistemas productores de señales o rotuladores que pueden usarse, ver la Patente Norteamericana No. 4.391.904.

Los marcadores pueden estar adheridos por medios indirectos: una molécula ligando (por ejemplo biotina) se une covalentemente a un anticuerpo. El ligando se une luego a otra molécula (por ejemplo, estreptavidina), la cual es inherentemente detectable o bien está unida covalentemente a un sistema de señales tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente.

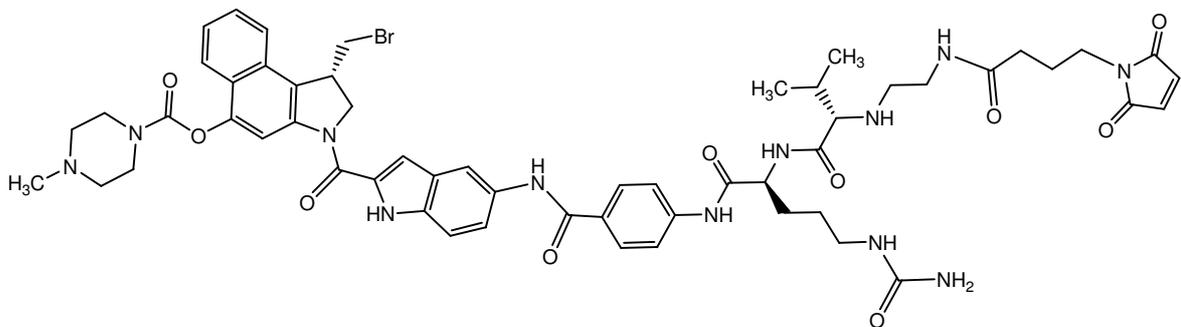
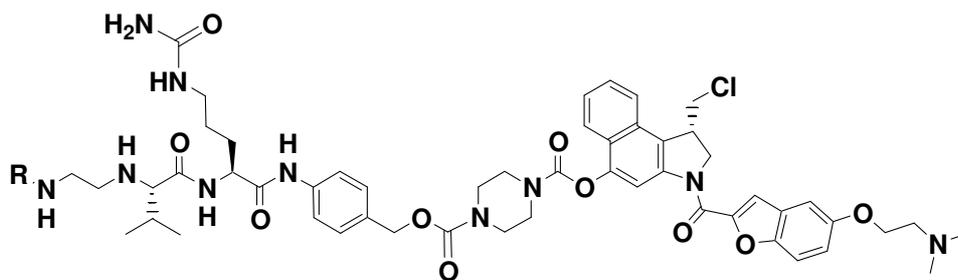
Ejemplos de Conjugados

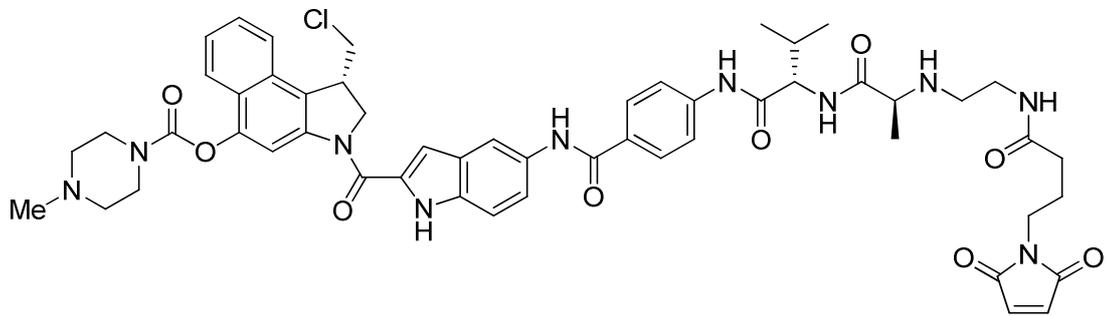
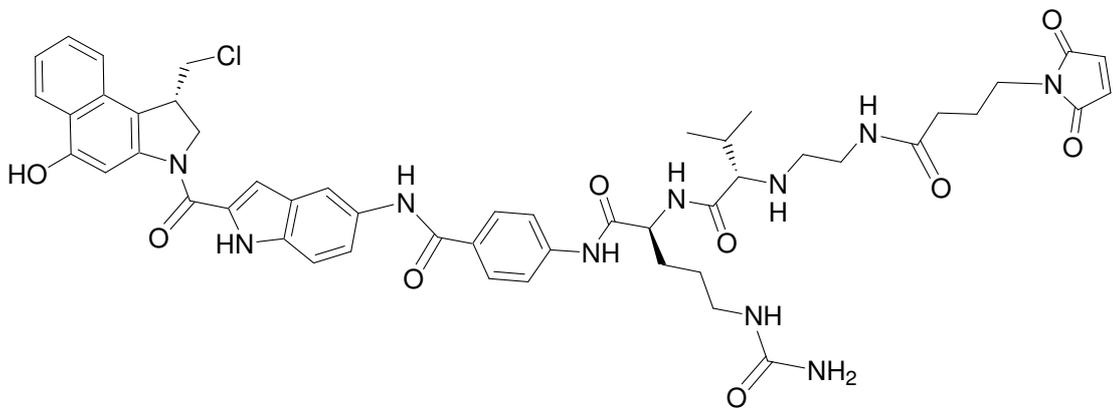
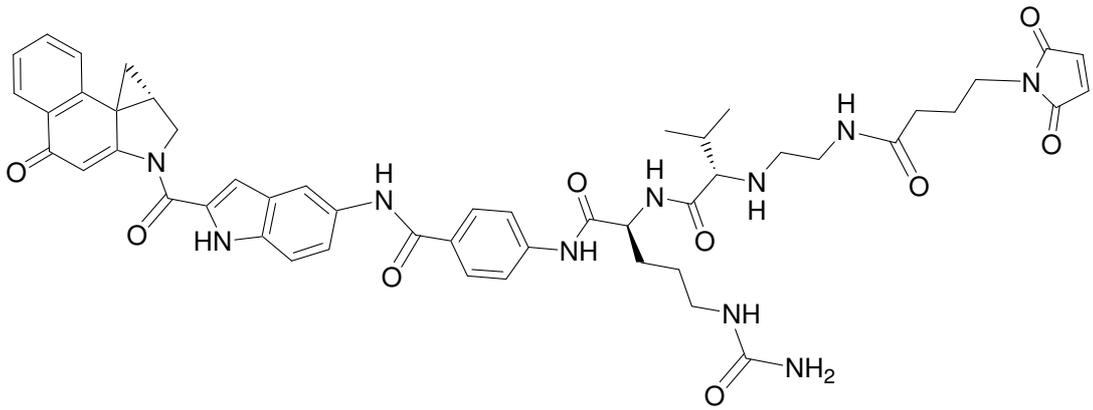
Ejemplos específicos de combinaciones de ligador-molécula asociada apropiados para conjugación o un anticuerpo de esta invención son los que se muestran a continuación:



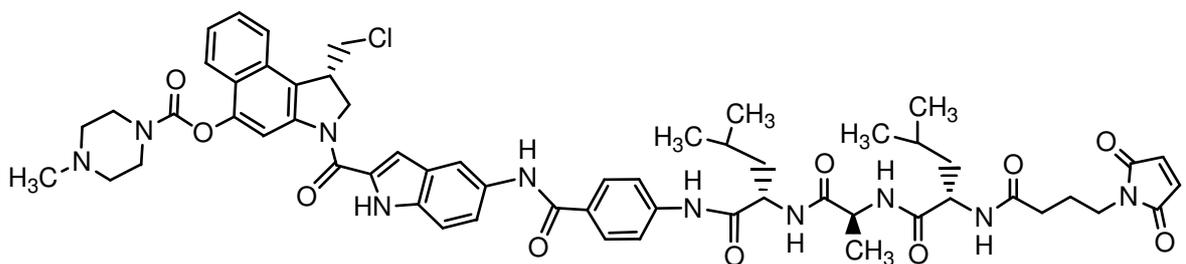
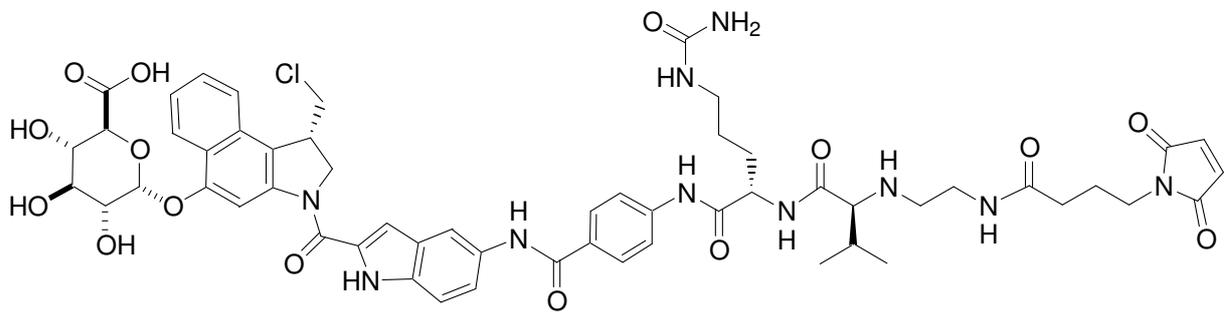


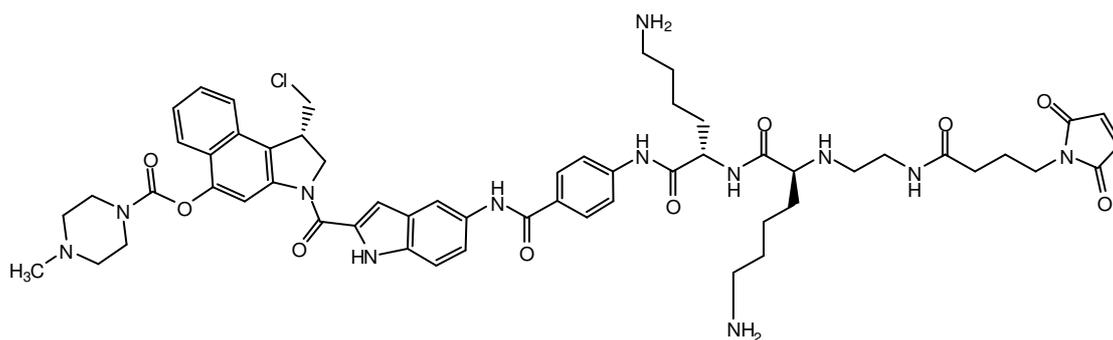
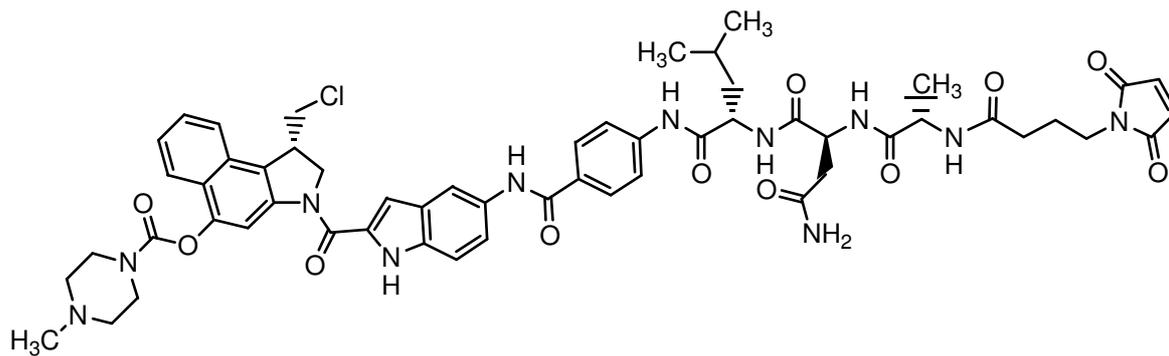
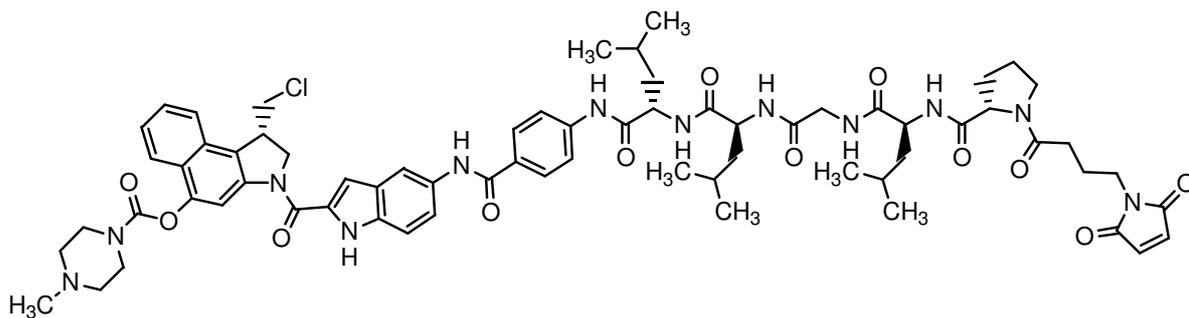
5



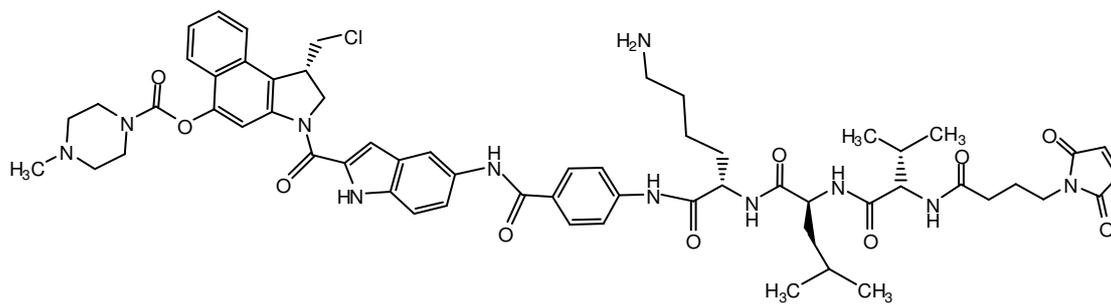


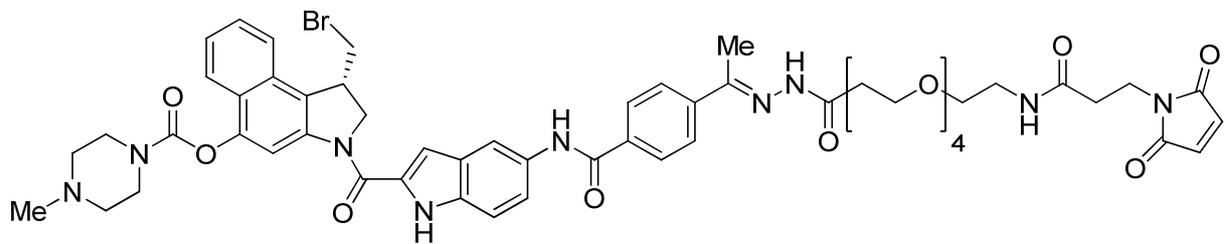
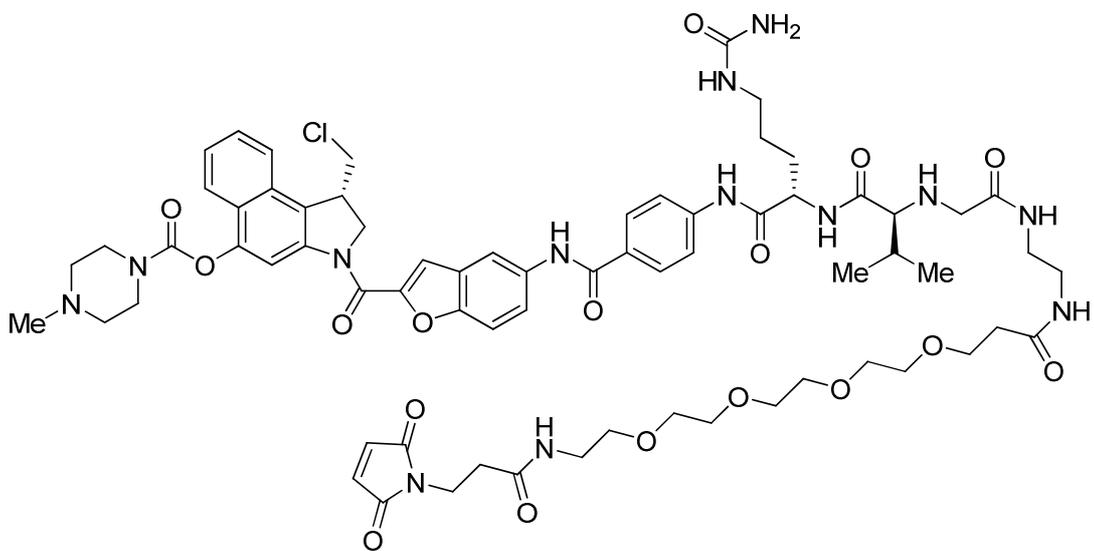
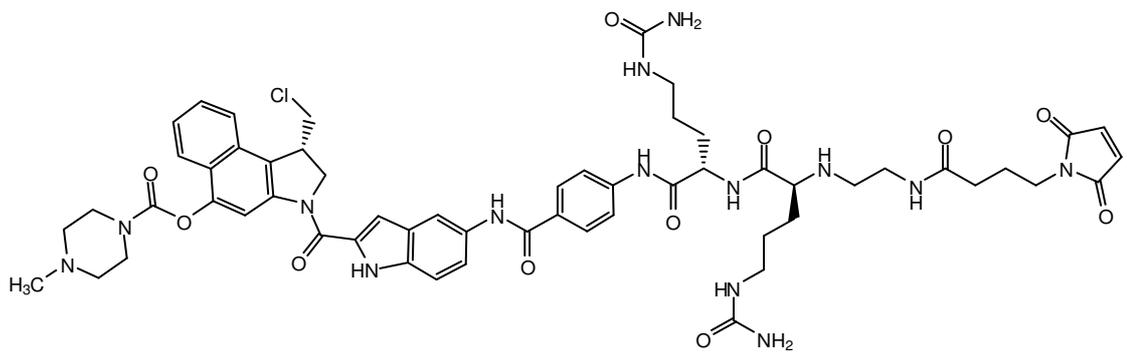
5



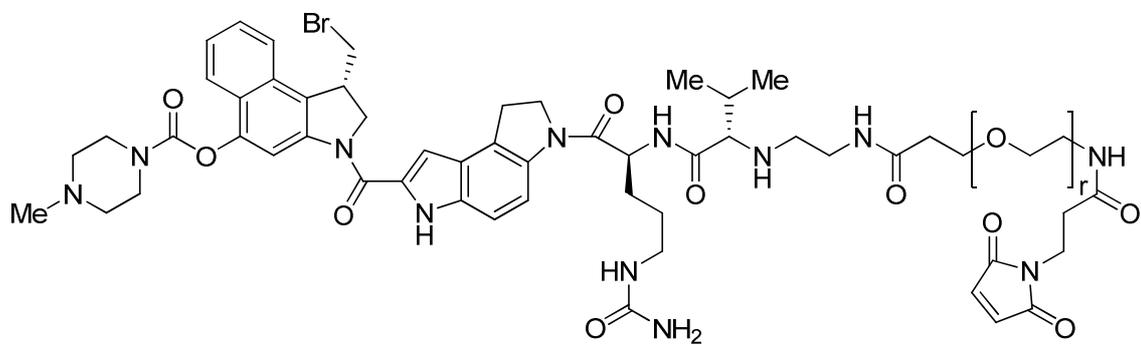


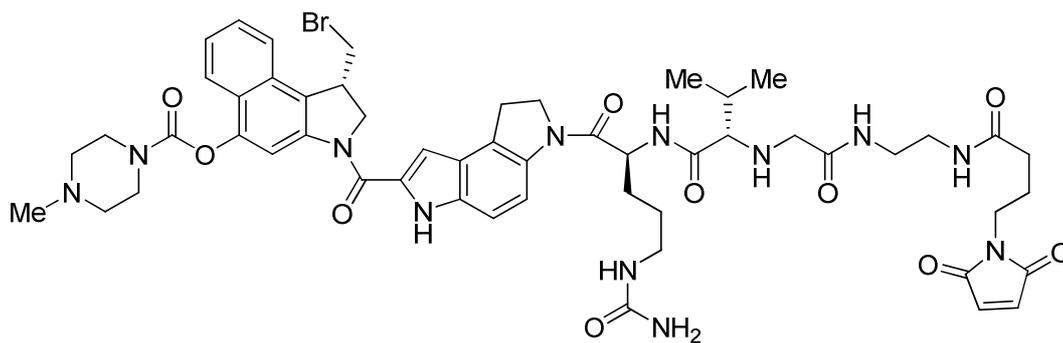
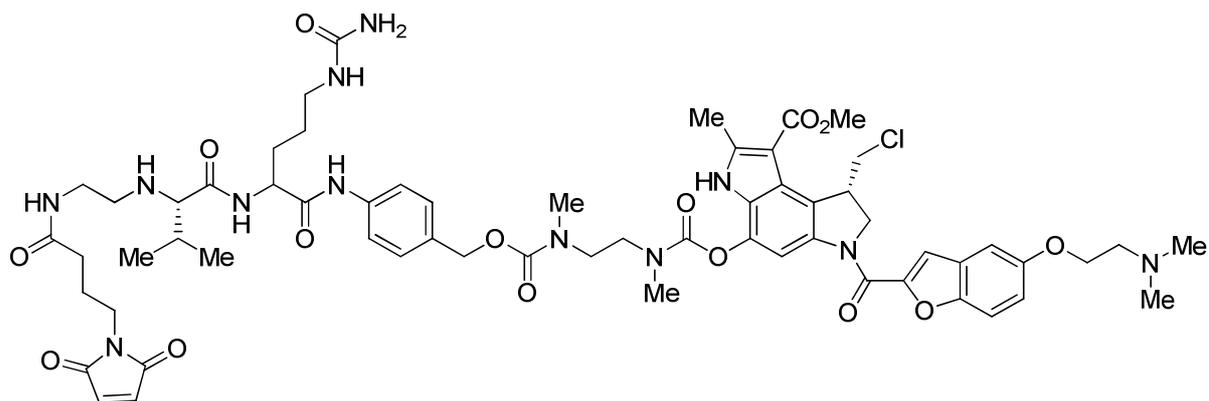
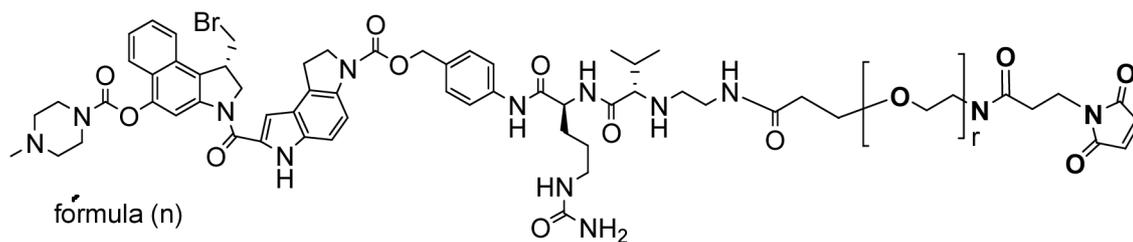
5



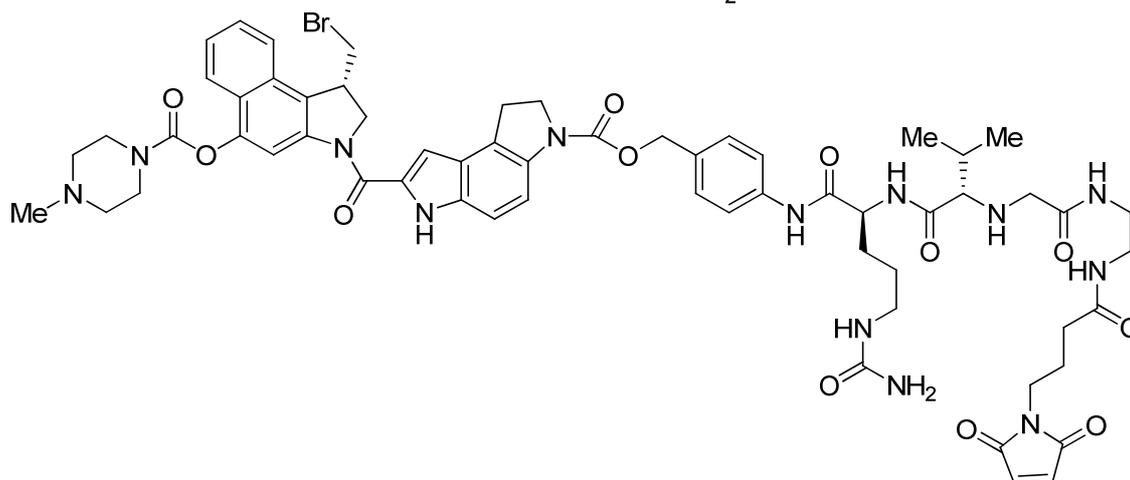


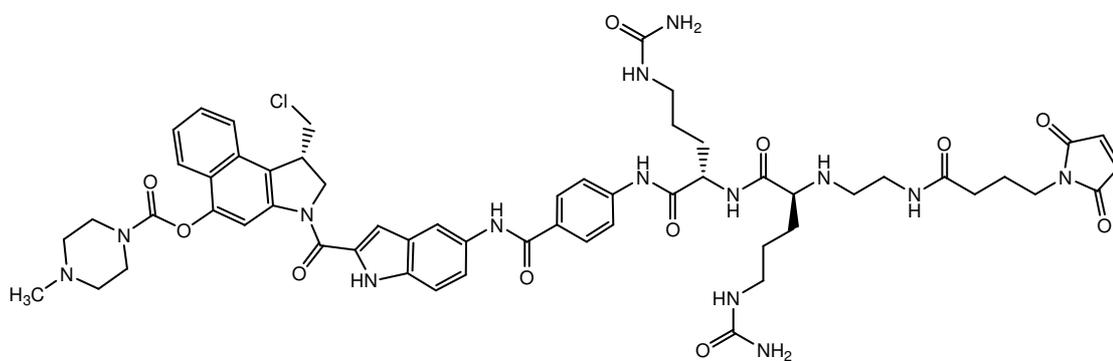
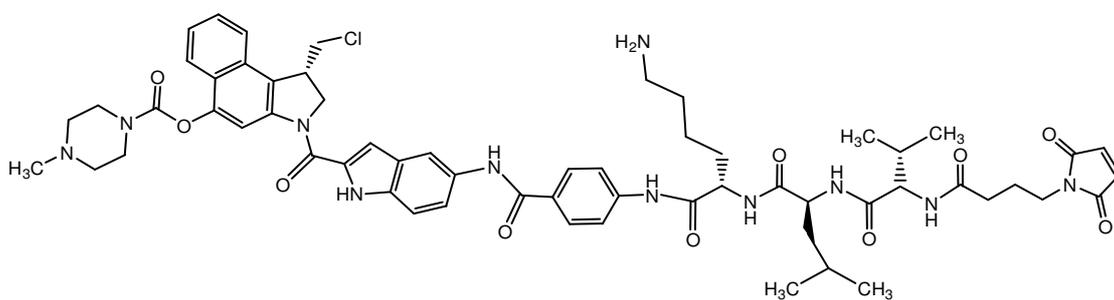
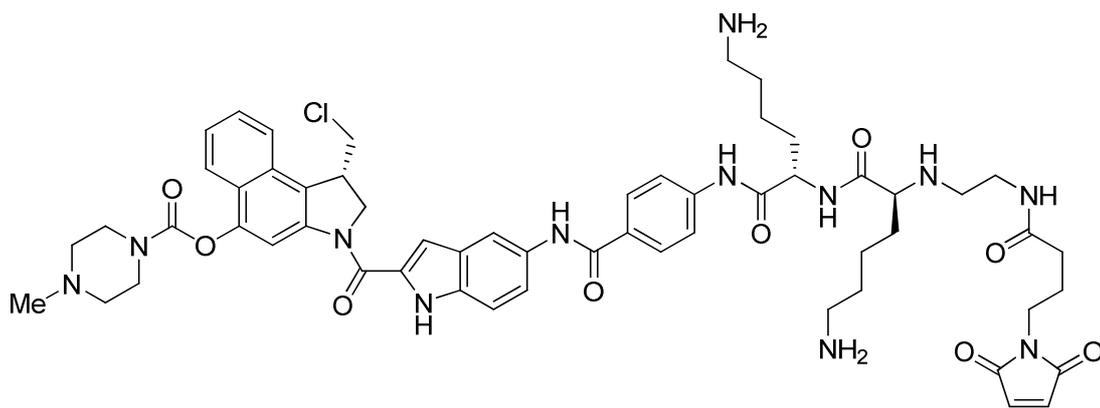
5



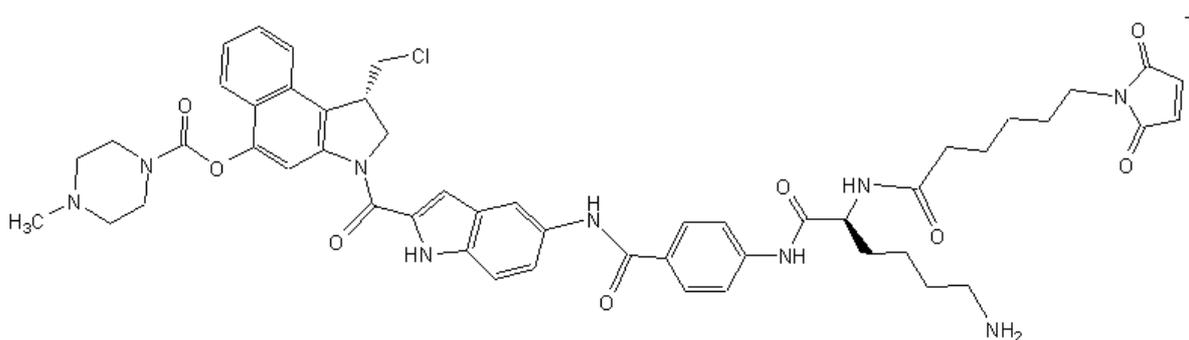


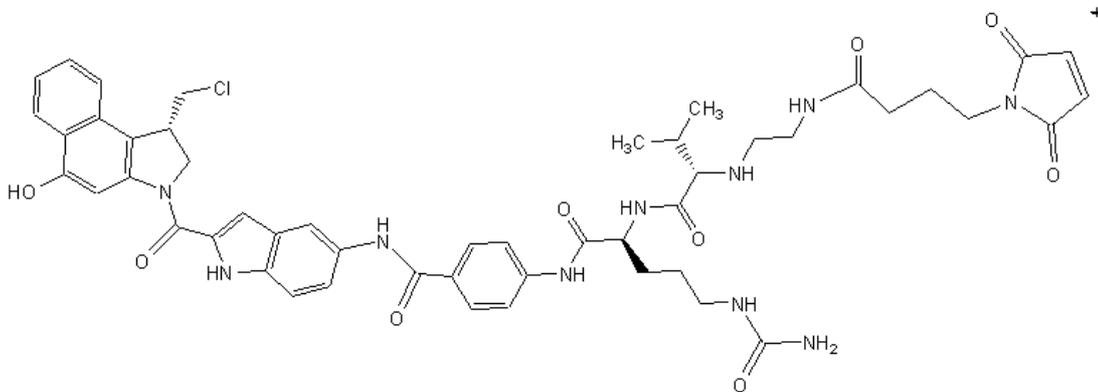
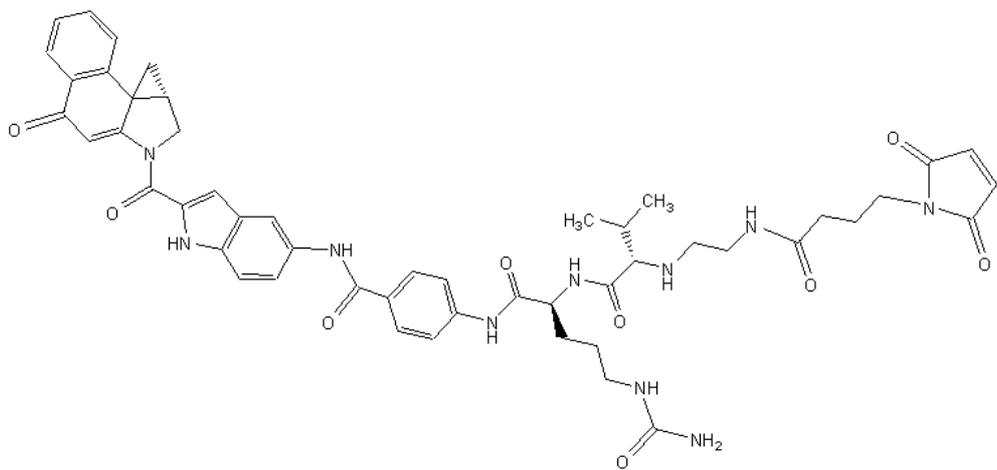
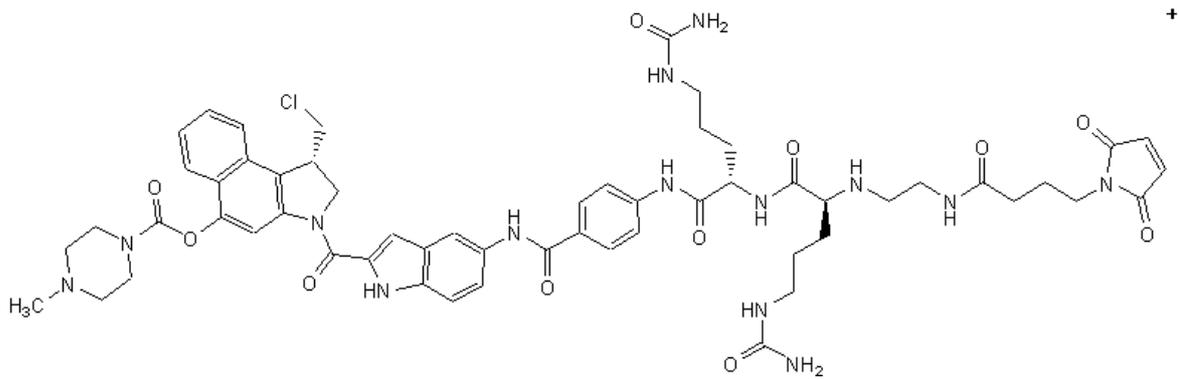
5



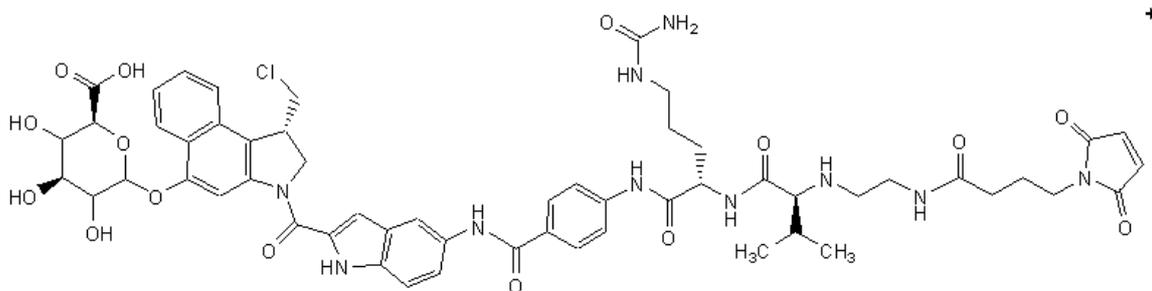


5

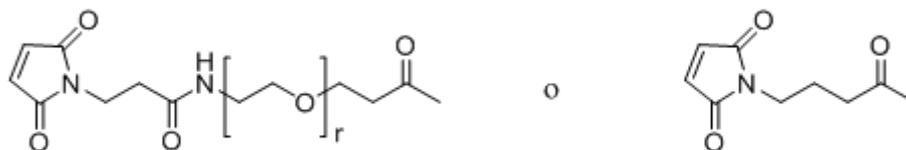




5



10 En los compuestos anteriores, cuando está presente el suscripto r en una fórmula, es un número entero en el rango de 0 a 24. R, siempre que está presente es:



Cada uno de los compuestos anteriores tiene un grupo maleimida y está listo para la conjugación con un anticuerpo a través de un grupo sulfhidrido sobre el mismo.

La conjugación con los anticuerpos de esta invención puede efectuarse también mediante otros tipos de funcionalidades químicas, tal como se describió anteriormente en el contexto de las moléculas biespecíficas.

Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción provee una composición farmacéutica que comprende uno o una combinación de anticuerpos monoclonales o porciones de adhesión al antígeno de los mismos, de acuerdo con la presente descripción, formulados, conjugados conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de esta descripción pueden administrarse también en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-mesotelina de la presente descripción combinado con por lo menos otro agente anticancer. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en terapia de combinación con los que se describen en forma más detallada a continuación.

Tal como se usa aquí "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes anti-bacterianos y anti-fungales, agentes isotónicos y retardadores de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente el vehículo es apropiado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, el inmunoconjugado o molécula biespecífica, pueden recubrirse con un material para proteger al compuesto contra la acción de ácidos y otras condiciones naturales que lo pueden inactivar.

Los compuestos farmacéuticos de esta descripción pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto principal y que no imparte ningún efecto toxicológico indeseable. Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de ácidos de base. Las sales de adición de ácido incluyen las que derivan de ácidos inorgánicos no tóxicos tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como también de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenilo-sustituídos, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las que derivan de metales alcalino-térreos tales como sodio, potasio, magnesio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de esta descripción puede incluir también un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, meta metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes metálicos tales como ácido cítrico, ácido tetraacético de etilendiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos apropiados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de esta descripción incluyen agua, etano, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilén glicol y similares) y mezclas apropiadas de éstos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de agentes tensoactivos.

Las composiciones pueden contener también coadyuvantes tales como preservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, *supra*, como por inclusión de varios agentes anti-bacterianos y anti-fungales, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Puede ser también deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. Además, la absorción prolongada de la

forma farmacéutica inyectable puede llevarse a cabo por inclusión de agentes que demoran la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para las preparaciones extemporáneas de soluciones o dispersiones inyectables. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de esta descripción ha sido contemplado. Pueden incorporarse también compuestos suplementarios activos en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas deben ser típicamente estériles y estables bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada apropiada para concentración elevada de fármaco. El vehículo puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene por ejemplo, agua, etanol, poliol (glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido y similares) y mezclas apropiadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, para el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de agentes tensoactivos. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio.

Las soluciones estériles inyectables pueden prepararse por microfiltración. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio dispersante básico, y los otros ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y secado por congelación (liofilización para proporcionar un polvo del ingrediente activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada hasta esterilización del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto tratado y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única, generalmente será la cantidad de composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, entre 100 % está cantidad estará en un rango de aproximadamente 0.01 por ciento hasta aproximadamente 99 % de ingrediente activo, preferiblemente desde aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 70 %, y más preferiblemente desde aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 30 % de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (es decir, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo único, en varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o bien la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente de acuerdo a lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria tal como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitaria de esta descripción está dictada y depende directamente de (a) las características especiales del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea lograr y (b) las limitaciones inherentes a la materia de formulación de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para la administración de un anticuerpo de esta invención la dosis está en un rango de desde aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más usualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1–10 mg/kg. Un ejemplo de régimen de tratamiento implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez por mes, una vez cada 3 meses o una vez cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa, usando con el anticuerpo que se administra, uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, dos o más de los anticuerpos monoclonales con especificidades de adhesión diferentes se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado entra dentro de los rangos indicados. El anticuerpo se administra usualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser por ejemplo, semanales, mensuales, trimestrales o anuales. Los intervalos pueden ser también irregulares de acuerdo a lo que indica la medición de los niveles de anticuerpos en la sangre para el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en el plasma de aproximadamente 1–1000 µg /ml y en algunos métodos aproximadamente 25–300 µg /ml.

Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y frecuencia varían dependiendo de la vida media del

anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos son los que muestran la vida media más larga, seguido de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes por un largo período de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere algunas veces una dosis relativamente elevada a intervalos relativamente cortos hasta que el avance de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra un mejoramiento parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. A continuación, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Para ser usado en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con proliferación celular anormal, se prefiere una concentración circulante de compuesto administrado de aproximadamente 0.001 μM a 20 μM , siendo especialmente preferido de 0.01 μM a 5 μM .

Las dosis de administración oral de los compuestos descritos aquí para los pacientes, están típicamente en un rango de desde aproximadamente 1 mg/día hasta aproximadamente 10.000 mg/día, más típicamente desde aproximadamente 10 mg/día hasta aproximadamente 1.000 mg/día, y más típicamente desde aproximadamente 50 mg/día hasta aproximadamente 500 mg/día. Manifestado en estos términos de peso corporal del paciente, las dosis típicas están en un rango de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 150 mg/kg/día, más típicamente desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 15 mg/kg/día, y más típicamente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 mg/kg/día, por ejemplo 5 mg/kg/día o 3 mg/kg/día.

En por lo menos algunas realizaciones, las dosis al paciente que retardan o inhiben el desarrollo del tumor pueden ser de 1 $\mu\text{mol/kg/día}$ o menos. Por ejemplo, las dosis al paciente pueden ser de 0.9, 0.6, 0.5, 0.45, 0.3, 0.2, 0.15, o 0.1 $\mu\text{mol/kg/día}$ o menos (con referencia a moles del fármaco). Preferiblemente, el conjugado de anticuerpo-fármaco retarda el desarrollo del tumor cuando se administra en la cantidad de dosificación diaria por un período de por lo menos 5 días.

Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden variar de manera de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, una composición y un modo de administración, y sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionada dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares o del éster, la sal o amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, el régimen de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud en general y la historia médica previa del paciente y factores similares bien conocidos en medicina.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-mesotelina de esta descripción da preferiblemente como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del daño o discapacidad debido a la enfermedad que lo aflige. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos portadores de tumores, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferiblemente el desarrollo del tumor, por lo menos en aproximadamente 20 %, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 40 %, aún más preferiblemente en por lo menos aproximadamente 60 %, y todavía más preferiblemente en por lo menos aproximadamente 80 % con relación a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el desarrollo del tumor puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede ser evaluada examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento de células, pudiendo medirse dicha inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o por otra parte puede mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia podrá determinar las cantidades basándose en factores tales como el peso del paciente, la gravedad de los síntomas del paciente y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Una composición de la presente descripción puede administrarse a través de una o más vías de administración usando uno o más de varios métodos conocidos en la materia. Tal como podrán apreciar los expertos en la materia la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para los anticuerpos de esta descripción incluyen la vía de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral" tal como se usa aquí significa modos de administración distintos de administración entérica ectópica, usualmente por inyección o incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, un anticuerpo de esta descripción puede ser administrado a través de una vía no parenteral tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulada. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácidos polilácticos. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, *Sustained y Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la materia, por ejemplo, una composición terapéutica de esta descripción puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin agujas tal como los descritos en las Patentes Norteamericanas 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos que son útiles en la presente descripción incluyen: Patente Norteamericana 4.487.603 (bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación a un régimen controlado); Patente Norteamericana 4.486.194 (dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel); Patente Norteamericana 4.447.233 (bomba de infusión para liberar medicación a un régimen de infusión preciso); Patente Norteamericana 4.447.224 (aparato de infusión implantable de flujo variable para una liberación continua de fármaco); Patente Norteamericana 4.439.196 (sistema de liberación osmótica del fármaco que tiene compartimientos de cámaras múltiples); y Patente Norteamericana 4.475.196 (sistema de liberación osmótica de fármacos). Estas patentes se incorporan aquí como referencia. Muchos otros implantes, sistema de liberación y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

Los anticuerpos de esta descripción pueden formularse para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de esta descripción cruzan la BBB (si se desea), éstos pueden formularse por ejemplo en forma de liposomas. Para los métodos de manufactura de liposomas ver por ejemplo, las Patentes Norteamericanas 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que son transportados selectivamente a células u órganos específicos, y así mejorar la liberación guiada de un fármaco. (Ver por ejemplo, Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Ejemplos de restos guiados incluyen folato o biotina (ver por ejemplo, Patente Norteamericana 5.416.016 de Low *et al.*); mannosidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A tensoactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); see also Keinanen y Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; Killion y Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

35 Usos y Métodos de la Invención

Los anticuerpos, particularmente los anticuerpos humanos, las composiciones de anticuerpos, las composiciones de conjugado de anticuerpo-molécula asociada y los métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* que involucran el diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por mesotelina. Por ejemplo, estas moléculas pueden ser administradas a células en cultivo *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, para tratar, prevenir y diagnosticar varios trastornos. Tal como se usa aquí, el término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por la actividad de mesotelina, particularmente pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con la expresión aberrante de mesotelina. Cuando conjugados de anticuerpo - molécula asociada, con mesotelina, se administran conjuntamente con otro agente, los dos pueden ser administrados en cualquier orden o simultáneamente.

50 Dada la adhesión específica de los anticuerpos de la invención para la mesotelina, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar específicamente la expresión de mesotelina y además, pueden usarse para purificar mesotelina a través de purificación de inmunoafinidad.

En una realización, las composiciones de la invención pueden usarse para detectar niveles de mesotelina, donde dichos niveles pueden ser luego ligados a ciertos síntomas de la enfermedad. Alternativamente, las composiciones pueden usarse para inhibir o bloquear la función mesotelina, la cual, a su vez, puede ser ligada para la prevención o mejoramiento de ciertos síntomas de la enfermedad, implicando de este modo a la mesotelina como un mediador para los pacientes que la sufren. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y otra muestra de control con el anticuerpo anti-mesotelina bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y mesotelina. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la mesotelina es detectado y comparado en la muestra y el control.

En otra realización las composiciones de la invención pueden ensayarse inicialmente para determinar la actividad de adhesión asociada con uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden ensayarse usando ensayos citométricos de flujo conocidos en la materia.

Las composiciones de la invención tienen utilidad adicional en la terapia y diagnóstico de enfermedades relacionadas con mesotelina. Por ejemplo, los inmunoconjugados pueden usarse para proporcionar *in vivo* o *in vitro* una o más de las actividades biológicas siguientes: para inhibir el crecimiento y/o muerte de una célula que expresa mesotelina; para intermediar en la fagocitosis o ADCG de una célula que expresa mesotelina en presencia de células efectoras humanas, o para bloquear la adhesión del ligando mesotelina a la mesotelina.

En una realización particular, las composiciones se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar varias enfermedades relacionadas con mesotelina. Ejemplos de enfermedades relacionadas con mesotelina incluyen entre otras, cánceres de ovario, pancreáticos, de estómago, pulmón, uterinos, endometriales, del conducto biliar, gástricos/esofágicos, colorrectales y de mama.

Las composiciones de la invención pueden comprender agentes que incluyen entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida e hidroxurea los cuales, por sí mismos, son particularmente eficaces a niveles que son tóxicos o sub-tóxicos para un paciente. La cisplatina se administra intravenosamente en una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra intravenosamente en forma de una dosis de 60–75 mg/ml una vez cada 21 días. La co-administración de los anticuerpos anti-mesotelina humana, o fragmentos de adhesión al antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos provee dos agentes anticáncer que operan a través de mecanismos diferentes y que proporcionan un efecto citotóxico para células tumorales humanas. Dicha co-administración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a los fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales, lo cual las convertiría en no reactivas con el anticuerpo.

También pueden usarse moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención para modular los niveles de FcγR o FcγR en células efectoras, tal como por taponamiento y eliminación de receptores en la superficie celular. Mezclas de receptores anti-Fc pueden usarse también para este propósito.

Las composiciones de la invención que tienen sitios de adhesión complementarios tales como porciones de IgG1, –2, o –3 o IgM que se adhieren a complementos, pueden usarse también en presencia del complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células comprende células diana con un agente de adhesión de la invención y pueden suplementarse células efectoras apropiadas mediante la adición de complemento o de un complemento que contiene suero. La fagocitosis de las células diana revestidas con un agente de adhesión de la invención puede mejorarse mediante adhesión de proteínas de complemento. En otra realización, las células diana revestidas con las composiciones (por ejemplo anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y bi-específicas) de la invención pueden ser también lisadas mediante complemento. En otra realización más, las composiciones de la invención no activan el complemento.

Las composiciones de la invención pueden administrarse también conjuntamente con complementos. Por lo tanto, la presente descripción provee composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones pueden ser ventajosas cuando el complemento está situado en proximidad íntima con los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Alternativamente, los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la invención y el complemento o suero pueden administrarse por separado.

Asimismo, dentro del alcance de la presente invención están los equipos que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención e instrucciones para su uso. El equipo puede contener además, uno o más reactivos adicionales tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se adhiere a un epítipo en el antígeno mesotelina distinto del primer anticuerpo humano).

Por consiguiente, a los pacientes tratados con composiciones de anticuerpo de la invención, se les puede administrar (antes de, simultáneamente con o después de la administración de una composición de la invención) otro agente terapéutico tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de la composición.

En otras realizaciones, el sujeto puede ser tratado adicionalmente con un agente que modula por ejemplo, realza o inhibe la expresión o actividad de los receptores Fcγ o Fcγ mediante, por ejemplo, tratamiento del sujeto con una citocina. Las citocinas preferidas para administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen factor estimulador de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), interferon-γ (IFN-γ), y factor de necrosis tumoral (TNF).

En una realización particular, la invención provee métodos para detectar la presencia del antígeno mesotelina en una muestra o para medir la cantidad de antígeno de mesotelina, que comprende poner en contacto la muestra y una muestra de control con un anticuerpo monoclonal humano, o con una parte de unión a antígeno del mismo, que se adhiere específicamente a mesotelina, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre un anticuerpo y una porción del mismo y mesotelina. Luego se detecta la formación de un complejo, donde una diferencia en la formación del complejo entre la muestra comparada con la muestra de control, es indicativa de la

presencia del antígeno mesotelina en la muestra.

En otras realizaciones, la invención provee métodos para tratar un trastorno mediado por mesotelina en un sujeto, por ejemplo, cánceres de ovario, pancreáticos, de estómago, pulmón, uterinos, endometriales, del conducto biliar, gástricos/esofágicos, colorrectal y de mama.

En una realización más, pueden usarse los inmunoconjugados de la invención para moléculas asociadas a células que expresan mesotelina mediante unión de dichas moléculas asociadas con el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-mesotelina puede conjugarse con cualquiera de los compuestos toxina descritos en las Patentes Norteamericanas 6.281.354; 6.548.530; 2003/0050331; 2003/0064984; 2003/0073852; y 2004/0087497; o WO 03/022806. Por lo tanto, la invención provee también métodos para localizar células *ex vivo* o *in vivo* que expresan mesotelina (por ejemplo, con un rótulo detectable tal como un radioisotopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). Alternativamente, los inmunoconjugados pueden usarse para matar células que tienen receptores superficiales de células de mesotelina, guiando las citotoxinas o radiotoxinas conjugadas a los anticuerpos de adhesión de mesotelina.

En vista de la asociación de mesotelina con ciertos tumores, la invención provee un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa mesotelina, que comprende poner en contacto la célula tumoral con un anticuerpo anti-mesotelina de la descripción para inhibir el crecimiento de células tumorales. En una realización preferida, el anticuerpo es conjugado con un agente terapéutico tal como una citotoxina. En realizaciones particularmente preferidas, las células tumorales que expresan mesotelina son una célula de mesotelioma o una célula tumoral asociada con cánceres de ovario, pancreáticos, de estómago, pulmón, uterino, endometrial, del conducto biliar, gástrico/esofágico, colorrectal y de mama. En otras realizaciones preferidas, la célula tumoral que expresa mesotelina es una célula de mesotelioma, una célula de tumor pancreático, una célula de tumor de ovario, una célula de tumor estomacal, una célula de tumor de pulmón o una célula de tumor endometrial. En otras realizaciones más la célula tumoral es de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en mesoteliomas, adenocarcinomas ováricos serosos papilares, carcinomas de ovario de células claras, carcinomas de ovario mulerianos mixtas, carcinomas de ovario mucinosos endometrioides, adenocarcinomas pancreáticos, adenocarcinomas pancreáticos ductales, carcinomas serosos uterinos, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas extrahepáticos del conducto biliar, adenocarcinomas gástricos, adenocarcinomas esofágicos, adenocarcinomas colorrectales y adenocarcinomas de mama.

Además, en otro aspecto, los anticuerpos anti-mesotelina y sus conjugados de anticuerpo y fármaco pueden usarse en el tratamiento de cáncer en un sujeto. Por consiguiente, la invención provee un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la descripción de modo que el cáncer sea tratado en el sujeto. Por ejemplo, en una realización particularmente preferida, los anticuerpos pueden usarse en el tratamiento de mesoteliomas, cánceres de ovario o cánceres pancreáticos. En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos se usan en el tratamiento de mesoteliomas, cánceres pancreáticos, cánceres de ovario, cánceres de estómago, cánceres de pulmón o cánceres endometriales. En otras realizaciones más, los anticuerpos se usan en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en mesoteliomas, adenocarcinomas ováricos serosos papilares, carcinomas de ovario de células claras, carcinomas de ovario mulerianos mixtos, carcinomas de ovario mucinosos endometrioides, adenocarcinomas pancreáticos, adenocarcinomas pancreáticos ductales, carcinomas serosos uterinos, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas extrahepáticos del conducto biliar, adenocarcinomas gástricos, adenocarcinomas esofágicos, adenocarcinomas colorrectales y adenocarcinomas de mama.

El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros tratamientos para cáncer, tales como cirugía y/o radiación y/o con otros agentes anti-neoplásicos tales como los agentes anti-neoplásicos discutidos y establecidos anteriormente, que incluyen fármacos quimioterapéuticos y otros anticuerpos antigénicos anti-tumorales tales como los que se adhieren a CD20, Her2, PSMA, Campath-1, EGFR y similares.

Opcionalmente, los anticuerpos para mesotelina pueden combinarse con un agente inmunogénico tal como una vacuna que comprende células cancerosas, antígenos tumorales purificados (que incluyen proteínas, péptidos y moléculas de carbohidratos recombinantes) células y células transfectadas con geles que codifican citocinas estimuladoras inmunitarias (He *et al* (2004) *J. Immunol.* 173:4919–28). Se han diseñado muchas estrategias experimentales para vacunación contra tumores (ver Rosenberg, S., 2000, *Development de Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60–62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring: 300–302*; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring: 414–428*; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring: 730–738*; see also Restifo, N. y Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, pp. 3023–3043 en DeVita, V. *et al.* (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice de Oncology*. Quinta Edición). En una de estas estrategias, se preparó una vacuna usando células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares demostraron que eran las más eficaces cuando las células tumorales fueron transducidas para expresar GM-CSF. GM-CSF ha demostrado que es un potente activador de presentación de antígeno para vacunación tumoral (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 90: 3539–43).

Otras vacunas para tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como Virus de Papiloma Humano (HPV), Virus de Hepatitis (HBV y HCV) y Virus del Sarcoma de Herpes de Kaposi (KHSV).

Otra forma de antígeno específico de tumores que puede usarse en una vacuna para tumores consiste en proteínas purificadas por shock por calor (HSP) aisladas del tejido tumoral mismo. Estas proteínas de shock por calor contienen fragmentos de proteínas de células tumorales y éstas HSPs son sumamente eficientes en la liberación de células que presentan antígenos para producir la inmunidad del tumor (Suot, R & Srivastava, P (1995) *Science* 269:1585–1588; Tamura, Y. *et al.* (1997) *Science* 278:117–120).

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno potentes que pueden usarse para sensibilizar respuestas específicas de antígeno. Las DC pueden producirse *ex vivo* y pueden cargarse con varios antígenos peptídicos y proteínas así como también con extractos de células tumorales (Nestle, F. *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328–332). Las DCs pueden transducirse también por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las DCs han sido fusionadas también directamente con células tumorales con propósitos de inmunización (Kugler, A. *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332–336). Como método de vacunación, la inmunización de DC puede combinarse eficazmente con tratamiento de anticuerpos anti-mesotelina para activar las respuestas anti-tumorales.

El uso de anticuerpos de anti-mesotelina puede combinarse también con tratamientos de cáncer standard. El tratamiento de anticuerpos anti-mesotelina puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr, M. *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301–5304). Otras terapias de combinación que pueden dar como resultado sinergia con tratamiento de anticuerpos anti-mesotelina, son radiación, cirugía y privación de hormonas. Los inhibidores de angiogénesis pueden combinarse también con tratamiento con anticuerpos anti-mesotelina.

El tratamiento con anticuerpos anti-mesotelina puede usarse también en combinación con anticuerpos bioespecíficos que guían células efectoras que expresan el receptor Fc alfa o Fc gamma a las células tumorales (ver, por ejemplo, Patentes Norteamericanas 5.922.845 y 5.837.243). Por ejemplo, los anticuerpos bioespecíficos receptor anti-Fc /antígeno anti tumor (por ejemplo., Her-2/neu) han sido usados para guiar macrófagos a sitios de tumores. Esta guía puede activar más eficazmente las respuestas específicas. Alternativamente, el antígeno puede ser liberado directamente a las DCs mediante el uso de anticuerpos bioespecíficos que se adhieren al antígeno tumoral y un marcador de superficies celulares específico de células dendríticas.

Los tumores evaden la supervisión inmunitaria huésped mediante una gran variedad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser superados mediante la inactivación de las proteínas inmunosupresoras expresadas por los tumores. Estos incluyen TGF-beta (Kehrl, J. *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037–1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198–200), y ligando Fas (Hahne, M. *et al.* (1996) *Science* 274: 1363–1365). Pueden usarse anticuerpos para cada una de estas entidades en combinación con anti-mesotelina para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias tumorales del huésped.

Otros anticuerpos que pueden usarse para activar la respuesta inmunitaria huésped pueden usarse en combinación con anti-mesotelina. Éstos incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas que activan la función de C y la presentación de antígeno. Los anticuerpos Anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad auxiliar de células T (Ridge, J. *et al.* (1998) *Nature* 393: 474–478) y pueden usarse conjuntamente con anticuerpos anti-mesotelina (Ito, N. *et al.* (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527–40). Los anticuerpos para moléculas estimuladoras de células T tales como CTLA-4 (por ejemplo, Patente Norteamericana No. 5.811.097, y 6.984.720), OX-40 (Weinberg, A. *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160–2169), 4-1BB (Melero, I. *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682–685 (1997), ICOS (Hutloff, A. *et al.* (1999) *Nature* 397: 262–266), PD-1 y/o PD-L1 proveen también un aumento de los niveles de activación de célula T y por lo tanto, dichos anticuerpos activadores de células T pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-mesotelina de la invención.

El trasplante de médula ósea se está usando corrientemente para tratar varios tumores de origen hematopoyético. Aunque el injerto versus enfermedad huésped es una consecuencia de este tratamiento, el beneficio terapéutico puede obtenerse por las respuestas de injerto versus tumor. Por lo tanto, el tratamiento con anticuerpo anti-mesotelina puede usarse en combinación con trasplante de médula ósea como parte de un régimen de tratamiento de tumores.

La presente descripción se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben considerarse limitativos.

Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos Monoclonales Humanos contra la Proteína Mesotelina

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-mesotelina se generaron usando ratones transgénicos que expresan genes de anticuerpos humanos de la manera siguiente.

Antígeno

Se usó una proteína de fusión soluble de mesotelina como antígeno para la inmunización. La proteína de fusión soluble está compuesta por una porción de 40 kD de mesotelina (que está asociada a membrana a través de una

unión GPI en mesotelina natural) ligada a su marbete His tag en su C-terminal. Esta proteína de fusión se denomina aquí "proteína de fusión de mesotelina– his hu". La proteína de fusión fue generada por métodos de ADN recombinante convencionales y se expresó en células de CHO transfectadas, las cuales secretaron la proteína de fusión soluble dentro de un sobrenadante de cultivo. Las células huésped CHO usadas para la transfección se obtuvieron en (Cat #11619–012). La proteína de fusión soluble secretada se purificó para ser usada como inmunógeno. Además, el sobrenadante de las células CHO que secretan la proteína de fusión mesotelina– his hu se usaron en los ensayos ELISA para rastrear HuMAbs (que se describen adicionalmente a continuación).

Ratones Transgénicos

Se prepararon anticuerpos monoclonales humanos para mesotelina humana usando ratones de la cepa lambda HCo7 x hu de un ratón transgénico del tipo HuMab Mouse™ ("ratón Hco7 x hu"). En esta cepa, el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno ha sido homocigóticamente disgregado tal como se describió en Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:811–820 y el gen de cadena pesada de ratón endógeno ha sido homocigóticamente disgregado tal como se describe en el ejemplo 1 de la WO 2001/09187. Además, esta cepa de ratón es portadora de un transgen de cadena ligera kappa humana KCo5, tal como se describió en Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845–851, un cromosoma artificial de levadura (YAC) portador de la mayor parte de lugar de cadena ligera lambda humana tal como se describió en WO 2000/026373, y un transgen de cadena pesada humana, HCo7, tal como se describió en la Patente Norteamericana 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807.

Inmunización de ratones

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para mesotelina humana, se inmunizaron ratones HCo7 x hu con proteína de fusión mesotelina–his–hu purificada. Los esquemas de inmunización generales han sido descritos en Lonberg, N. *et al* (1994) *Nature* 368(6474): 856–859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845–851 y WO 98/24884. Los ratones eran de 3–4 meses de edad en la primera infusión de antígeno. Se usó para inmunizar los ratones intraperitonealmente y subcutáneamente, una preparación de antígeno de mesotelina–his humana recombinante purificada (10 µg de células de mamífero transfectadas que expresan la proteína de fusión). El antígeno se mezcló a 1:2 con coadyuvante RIBI (Sigma Cat#M6536).

Los ratones fueron inmunizados 9 veces a intervalos semanales. La respuesta inmunitaria se monitoreó por sangrado retroorbital. El plasma fue rastreado mediante un análisis ELISA indirecto (tal como se describe a continuación), y se usaron para las fusiones los ratones con las valoraciones más elevadas para IgG humano de mesotelina anti–humana. Los ratones recibieron un refuerzo final mediante inyección (IV) e intraperitoneal (IP) del antígeno soluble 2 y 3 días antes del sacrificio y remoción del bazo.

Selección de ratones productores de anticuerpos monoclonales humanos de mesotelina anti–humanos.

Para seleccionar los ratones Hco7 x hu, productores de altas valoraciones de anticuerpos de anti–mesotelina, se usó un ensayo ELISA indirecto para monitorear las valoraciones de anticuerpos en el suero de la manera siguiente: placas microevaluadoras recubiertas con anticuerpo de marbete His (Novagen Cat. #71184) fueron hidratadas y bloqueadas con 300 µL/receptáculo de 1 % BSA/DPBS durante 10 a 15 minutos. Después de varios lavados, se agregaron (50 µL/receptáculo) de sobrenadante de células CHO que secretaban la proteína de fusión mesotelina–his hu, valorada para una señal máxima, y se incubó durante una hora. Después de lavar las placas con DPBS/Tween, diluciones de plasma de ratones inmunizados con mesotelina (a partir de dilución 1:50 y dilución seriada 1:2 11 veces) se agregaron a cada receptáculo y se incubaron durante 1 hora. Las placas se lavaron con DPBS/Tween y se incubaron durante 1 hora con anticuerpos policlonales de IgG de cabra – anti– humanos, conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Labs Cat. #115–036–098). Luego se agregó sustrato de ABTS (ácido 2,2'–azino–bis[3–etilbentiazolin 6–sulfónico) (Sigma Cat. #S9941) y las placas fueron analizadas espectrofotométricamente a OD 415 nm. La valoración se definió como la dilución del suero que produjo un OD que es dos veces el OD básico. La valoración se calculó usando un patrón Excel. Los ratones que desarrollaron las valoraciones más altas de anticuerpos mesotelina anti–humana se usaron para las fusiones. Las fusiones se llevaron a cabo tal como se describe a continuación y los sobrenadantes de hibridomas se ensayaron para determinar la actividad de mesotelina anti–humana usando dos formatos de ensayo ELISA diferentes descritos también a continuación.

Generación de Hibridomas Productores de Anticuerpos Monoclonales Humanos para la Proteína Mesotelina

Esplenocitos de ratón aislados de ratones HCo7 x hu de alta valoración y un asociado de fusión de mieloma de ratón se fusionaron con un campo eléctrico basado en electrofusión usando un electroporador de fusión de células de cámara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Suspensiones de células únicas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se fusionaron con un número igual de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580). Las células resultantes se depositaron a 2.0×10^4 células/receptáculos en placas microevaluadoras de fondo plano en un medio DMEM que contenía alto contenido de glucosa (Cellgro #10–013–CM) y 10 % de suero de ternero fetal (Hiclone #SH30071.03), y suplementado con beta–mercaptoetanol (1000X, Gibco #21985–023), 7 mM HEPES (Cellgro 25–060–CI), 2 mM L–glutamina adicional

(Cellgro 25-005-CI), HAT (50X, Sigma #H-0262), medio acondicionado con 5 % de Factor de Clonación de Hibridoma (BioVeris #210001), 10 % P388DI (ATCC #CRL TIB-63) y Penicilina-Estreptomycinan (100x, Cellgro #30-002-CI). Después de aproximadamente 7 días, parte del medio que contenía HAT fue reemplazado con medio que contenía HT (Cellgro #25-047-CI).

5 Después de 10 a 12 días, se rastrearon los receptáculos individuales en un ensayo ELISA directo para ver los receptáculos que contenían anticuerpos de cadena ligera kappa de IgG/humana/ kappa humana o anticuerpos de cadena ligera IgG humana/lambda humana. En el formato ELISA directo, las placas microevaluadoras se recubrieron con IgG F(ab')₂ Fc anti-humano de cabra específico (Jackson ImmunoResearch Labs, Cat. # 109-006-098), 2.5 µg/ml, 50 µl/receptáculos, se incubaron durante 1 hora y luego se bloquearon con 300 µL/receptáculo de 1 % de BSA/DPBS durante 15 minutos. Se removi6 el buffer bloqueador y se removieron las placas de fusión (50 µL/receptáculo) y se incubaron durante 1 hora. Las placas se lavaron con DPBS/Tween y luego se incubaron durante 1 hora con anticuerpos policlonales de cadena ligera kappa anti-humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Betil Cat. #A80-115P) o con anticuerpos policlonales de cadena ligera lambda anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Biosource Cat. #10904). Después de lavado, las placas fueron reveladas con sustrato ABTS y se analizaron espectrofotométricamente a OD 415 nm. Los receptáculos con un OD>0.75 elevado, fueron seleccionados para un análisis más.

20 Las células de hibridoma de receptáculos positivos para cadena ligera IgG/humana/kappa humana o cadena ligera lambda IgG/humana/ lambda humana fueron transferidos a cultivos de 24 receptáculos. Unos pocos días después, el sobrenadante de células de receptáculos individuales fue rastreado nuevamente para determinar especificidad usando un ELISA indirecto para identificar hibridomas productores de anticuerpos IgG humanos específicos para mesotelina humana. El protocolo para ELISA indirecto que se usó para el rastreo secundario de los hibridomas fue el mismo que se describió anteriormente para ensayar la valoración de anticuerpo del suero en ratones Hco7 x hu, excepto que el sobrenadante de muestra fue de cultivos positivos de hu IgG/hu kappa o hu IgG/hu lambda.

30 Los hibridomas fueron clonados mediante dilución seriada y fueron rastreados dos veces. Los ensayos de caracterización múltiple (descritos en los ejemplos siguientes) se llevaron a cabo usando sobrenadantes de cultivos de proliferación excesiva de 24 receptáculos antes de la clonación. Se seleccionaron diez anticuerpos y sus características se confirmaron usando anticuerpo clonal producido y purificado *in vitro*. Para secuenciar y para análisis adicionales, se seleccionaron tres anticuerpos 3C10 (nombre original del clon: 1382.210.3C10.1.6), 6A4 (nombre original del clon: 1382.210.6A4.1.6) y 7B1 (nombre original del clon: 1382.210.7B1.2.18).

Ejemplo 2: Caracterización Estructural de Anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1

35 Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los mAbs expresadas por los clones 3C10, 6A4 y 7B1, tal como se describió en el Ejemplo 1, se secuenciaron usando técnicas de secuenciamiento convencionales y las proteínas expresadas se caracterizaron mediante análisis químico convencional de proteínas. Se halló que los tres clones expresaban un anticuerpo que comprende una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa.

45 Las secuencias nucleotídicas y de aminoácido de la V_H de 3C10 se muestran en La Figura 1A y en la SEC ID NO: 25 y 19, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácido de V_L kappa de 3C10 se muestran en La Figura 1B y en las SEC ID NO: 28 y 22, respectivamente.

50 Las comparaciones de las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada 3C10 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana demostraron que la cadena pesada 3C10 utiliza un segmento V_H de línea germinal humana V_H 3-33, un segmento D de línea germinal human D3-10 y un segmento JH de línea germinal humana JH 4B. Otro análisis de la secuencia 3C10 V_H usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada tal como se muestra en La Figura 1A y en la SEC ID NOs: 1, 4 y 7, respectivamente.

55 Las comparaciones de la secuencia de inmunoglobulina de cadena livana 3C10 con las secuencias humans de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal demostraron que la cadena ligera kappa 3C10 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_KL6 y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 4. Otro análisis de la secuencia 3C10 V_K usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CD3 tal como se muestra en la Figura 1B y en las SEC ID NOs: 10, 13 y 16, respectivamente.

60 Las secuencias de nucleótido y de aminoácido de la V_H de 6A4 se muestran en La Figura 2A y en las SEC ID NO: 26 y 20, respectivamente. Las secuencias de aminoácido y nucleótido de la V_L de 6A4 se muestran en la Figura 2B y en las SEC ID NO: 29 y 23, respectivamente.

65 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 6A4 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostraron que la cadena pesada 6A4 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-33, un segmento D de la línea germinal humana D3-10, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 4B. Otro análisis de la secuencia 6A4 V_H usando el sistema Kabat de

determinación de región de CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 tal como se muestra en la Figura 2A y en las SEC ID NOs: 2, 5 y 8, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 6A4 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena ligera kappa 6A4 utiliza un segmento V_k de línea germinal humana $V_k L6$ y un segmento J_k de la línea germinal humana JK 4. Otro análisis de la secuencia 6A4 V_k usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CD3 tal como se muestra en la Figura 2B y en las SEC ID NOs: 11, 14 y 17, respectivamente.

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácido de V_H de 7B1 se muestran en la Figura 3A y in SEC ID NO: 27 y 21, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácido de la V_L de 7B1 se muestran en la Figura 3B y en las SEC ID NO: 30 y 24, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 7B1 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada 7B1 utiliza un segmento V_H de una línea germinal $V_H 3-7$, un segmento D de la línea germinal humana D3-10, y un segmento JH de línea germinal humana JH 6B. Otro análisis de la secuencia 7B1 V_H usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 tal como se muestra en la Figura 3A y en las SEC ID NOs: 3, 6 y 9, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 7B1 con la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena ligera kappa 7B1 utiliza un segmento V_k de una línea germinal humana $V_k A27$ y un segmento J_k de línea germinal humana JK2. Otro análisis de la secuencia 7B1 V_k usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 tal como se muestra en la Figura 3B y en las SEC ID NOs: 12, 15 y 18, respectivamente.

La Figura 4 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable 3C10 y 6A4 (SEC ID NOs: 19 y 20, respectivamente) con la línea germinal $V_H 3-33$ que codifica la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 31). Se delinearón las regiones CDR1, CDR2 y CDR3.

La Figura 5 muestra la alineación de las secuencias de aminoácido 3C10 y 6A4 kappa variable de cadena ligera (SEC ID Nos: 22 y 23, respectivamente) con la secuencia de aminoácidos codificada de línea germinal $V_k L6$ (SEC ID NO: 33). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos 7B1 variable de cadena pesada (SEC ID No: 21) con la secuencia de aminoácidos codificada de línea germinal $V_H 3-7$ (SEC ID NO: 32). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos 7B1 y kappa variable de cadena ligera (SEC ID No: 24,) con la secuencia de aminoácidos codificada de línea germinal $V_k A27$ (SEC ID NO: 34). Las CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

Las regiones variables 3C10, 6A4 y 7B1 pueden convertirse a anticuerpos de longitud total de cualquier isotipo deseado, usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo ADN que codifica las regiones V_H y V_L pueden ser clonadas en un vector de expresión que es portador de las regiones constantes de cadena pesada y ligera, de manera que las regiones variables estarán ligadas operativamente a las regiones constantes. Alternativamente, pueden usarse vectores separados para la expresión de la cadena pesada de longitud total y la cadena ligera de longitud total. Ejemplos no limitativos de vectores de expresión apropiados para ser usados para la creación de anticuerpos de longitud total incluyen los vectores pIE descritos en la patente norteamericana 2005/0153394 de Black.

Ejemplo 3: Caracterización de las Propiedades de Adhesión de Anticuerpos Monoclonales de Mesotelina.

En este ejemplo, la adhesión de los mABs 3C10, 6A4 y 7B1 a mesotelina de superficie celular fue examinada mediante citometría de flujo. Además se analizó la cinética de adhesión a mesotelina mediante análisis BIACORE.

A. Estudios de Citometría de Flujo

Para ensayar la capacidad de los anticuerpos para adherirse a la proteína mesotelina de superficie celular, los anticuerpos fueron incubados con cuatro células diferentes que expresaban mesotelina: OVCAR3 (ATCC Designación HTB-161, una línea de células de cáncer de ovario humano), NCI-H226 (ATCC Designación CRL-5826, un mesotelioma derivado de pulmón humano), CFPAC-1 (ATCC Designación CRL-1918, una línea de célula de cáncer pancreático humano), y KB (ATCC Designación CCL-17, una línea de células de carcinoma oral humano). Para los estudios de citometría de flujo, los anticuerpos monoclonales 3C10, 6A4 y 7B1 se diluyeron con 1x PBS +

0.1 % BSA frío a 40 µg/ml. Para la reacción de adhesión, se agregaron 50 µl de anticuerpo diluido a una suspensión de 50 µl de células que contenían 4×10^5 células y la mezcla se incubó en hielo durante 30–60 minutos. Las células fueron luego lavadas tres veces con 1x PBS + 0.1 % BSA. Se agregó una dilución de 1:50 de un fragmento de IgG F γ F(ab)2 anti–humano rotulado con R–ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch Labs, Cat. # 109–116–098) y la mezcla se incubó en hielo durante 1 hora, seguido de lavado, dos veces, con 1x PBS + 0.1 % BSA frío. Después del lavado final, se agregaron 200 µl de 1x PBS + 0.1 % BSA frío a cada solución y se llevó a cabo el análisis de adhesión al anticuerpo mediante FACS.

Los resultados del análisis de citometría de flujo se resumen más abajo en la Tabla 1, la cual muestra una CE₅₀ para la adhesión a las cuatro líneas diferentes de células. Los resultados demuestran que los tres anticuerpos monoclonales se adhieren efectivamente a células superficiales de mesotelina humana.

Anticuerpo	Células EC ₅₀ (nM)	Células NCI–H226 CE ₅₀ (nM)	Células CFPAC–1 CE ₅₀ (nM)	Células KB CE ₅₀ (nM)
3C10	0.2126	0.1968	0.1933	0.1441
6A4	0.1697	0.1556	0.1932	0.1815
7B1	0.1103	0.6642	0.0643	0.06793

B. Análisis BIACORE

La adhesión de los anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1 a la proteína de fusión His de mesotelina soluble se examinó mediante BIACore™ usando un método capturado. Los anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1 fueron cada uno capturados por separado en un chip CM5 recubierto con una proteína G (Pierce, Rockford, IL) a una densidad elevada (4000RUs). El recubrimiento se efectuó basándose en el procedimiento de inmovilización standard recomendado por el fabricante. Después que el anticuerpo purificado 3C10, 6A4 o 7B1 fue capturado en la proteína G, se inyectó una serie de concentración de proteína de fusión His de mesotelina humana recombinante (450, 225, 112.5, 56, y 28 nM) sobre el anticuerpo capturado durante 2 minutos a un régimen de fluidez de 25 µL/ml. El antígeno se dejó disociar durante 8 minutos. Se llevaron a cabo controles de isotipo en el chip, y los datos se usaron para restar la adhesión no específica. Todos los análisis se llevaron a cabo en un instrumento de resonancia plasmónica Biacore 2000 o 3000, usando software BIACore Control v 4.01. Los datos fueron analizados usando software BiaEvaluation v4.01.

Los resultados se muestran en la Tabla 2 siguiente. Los resultados BIACore para 3C10, 6A4 y 7B1 confirman los resultados de la citometría de flujo, que todos los tres anticuerpos son capaces de adhesión con alta afinidad a mesotelina humana.

Anticuerpo	K _D x 10 ⁻⁹ (M)	k _{on} (1/Ms) x 10 ⁴	k _{off} (1/s) x 10 ⁻⁴
3C10	5.8	6.30	3.62
6A4	5.9	6.39	3.77
7B1	2.4	7.15	1.71

Para investigar los epítomos adheridos por los 7B1 mAbs 3C10, 6A4 y 7B1 se llevaron a cabo análisis de adhesión con BIACore. Los mAbs 3C10 y 7B1 fueron ligados covalentemente a un chip CM5 (chip recubierto con carboxi metil dextrano) por medio de aminas primarias, usando química de acoplamiento de amina convencional y equipo provisto por Biacore. Mezclas del complejo de anticuerpo–antígeno se dejaron fluir a través de anticuerpos inmovilizados. Las concentraciones de anticuerpo fueron unas series de dos diluciones comenzando a, entre 50 y 500 nM. La concentración de mesotelina estaba comprendida entre 22 y 44 nM. Anticuerpos y mesotelina fueron pre–incubados durante por lo menos 1 hora antes de la inyección. Mezclas de anticuerpo–antígeno (15 µL) fueron inyectados a un régimen de flujo de 6 µl/min. Anticuerpos que tienen epítomos superpuestos competirán (disminuirán la respuesta al incrementar la concentración de anticuerpos) mientras que aquellos con epítomos distintos se adherirán simultáneamente al antígeno. Se incrementará la respuesta al incrementarse la concentración de anticuerpo). Los resultados fueron que los mAb 3C10 se unieron al mismo (o a un epítomo muy similar) al mAb K1 descrito previamente de anti–mesotelina de ratón. El mAb 7B1 se unió a un epítomo distinto del 3C10 y K1. El mAb 6A4 fue capaz de bloquear a ambas adhesiones, la 3C10 y 6A4 a la mesotelina recombinante.

Ejemplo 4: Caracterización de la Estabilidad de Anticuerpos Monoclonales de Mesotelina

En este ejemplo, la estabilidad de mAbs 3C10, 6A4 y 7B1 fue examinada en análisis químicos de estabilidad sin plegamiento y térmica, de la manera siguiente.

La estabilidad de los anticuerpos monoclonales anti–mesotelina se comparó midiendo el punto medio de la desnaturalización química mediante espectroscopia de fluorescencia. Las mediciones de fluorescencia de la desnaturalización química se llevaron a cabo en un SPEX Fluorolog 3.22 equipado con un lector de placa Micromax

(SPEX, Edison, NJ). Las mediciones se llevaron a cabo en muestras de anticuerpos que se habían dejado equilibrar durante 20 horas en 16 concentraciones diferentes de clorhidrato de guanidinio (GdHCl) en buffers PBS comprendido entre desde 0 a 6 moles. Las mediciones se efectuaron en placas de 384 receptáculos de superficie no adherente, negras, de bajo volumen, (Corning, Acton, MA) y se requirió 1 μM de anticuerpo en un volumen de receptáculo de 12 μL . La fluorescencia fue excitada a 280 nm y los espectros de emisión se midieron entre 320 y 400 nm. La velocidad de escaneo fue de 1 segundo por nm y las hendiduras se fijaron a 5 nm de paso de banda. Se efectuó un blanco buffer, usando PBS y automáticamente se restó de los datos. Los datos se ajustaron a un modelo de desnaturalización de dos estadios usando el software GrafPad Prism. Los resultados, expresados como concentración molar de GdHCl que fue el punto medio sin plegado se muestran abajo en la Tabla 3.

Anticuerpo	Punto Medio de desplegamiento (GdHCl, M)
3C10	2,50
6A4	2,67
7B1	2,21

La estabilidad térmica de los anticuerpos monoclonales anti-mesotelina se determinó por análisis calorimétrico de la temperatura de fusión de los anticuerpos.

Las mediciones calorimétricas de las temperaturas de fusión (T_m) se llevaron a cabo en una plataforma microcalorimétrica de escaneo diferencial VP-Capillary DSC que se combinó con un automuestreador (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA). Los datos de desnaturalización en los anticuerpos se obtuvieron por calentamiento de las muestras a una concentración de 0.25 mg/ml, desde 30 a 95 $^{\circ}\text{C}$ a un régimen de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Las muestras de anticuerpos estuvieron presentes en solución salina regulada con fosfato (PBS) a pH 7.4. Se usó el mismo buffer en la célula de referencia para obtener la capacidad de calor molar por comparación. Los termogramas observados se corrigieron en la línea de base y los datos normalizados se analizaron basándose en un modelo non-2-state usando el software Origin v7.0. Los resultados, expresados como temperatura (en $^{\circ}\text{C}$) en la cual se observaron picos indicativos de la fusión de anticuerpos, se muestran en la Tabla 4 siguiente.

Anticuerpo	Pico 1 ($^{\circ}\text{C}$)	Pico 2 ($^{\circ}\text{C}$)	Pico 3 ($^{\circ}\text{C}$)
3C10	67		81
6A4	69		81
7B1	69.8	72.7	82

Los resultados anteriores indican que los anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1 tienen propiedades de estabilidad química y térmica deseables.

Ejemplo 5: Internalización de Anticuerpos de Mesotelina

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1 para ser internalizados mediante células que expresan mesotelina, de la manera siguiente.

En la primera serie de análisis, se usó un ensayo Hum-ZAP para examinar la internalización de anticuerpos. En el ensayo Hum-ZAP (equipos que son comercialmente obtenibles en Advanced Targeting Systems, San Diego, CA), los anticuerpos de anti-mesotelina se dejaron reaccionar con células que expresaban mesotelina, y con un anticuerpo IgG anti-humano de cabra, conjugado con la toxina saporina (una proteína inactivadora de ribosoma). Mediante internalización del anticuerpo anti-mesotelina primario, el anticuerpo secundario conjugado con saporina fué recogido también en el interior de la célula, lo cual dió como resultado la inhibición de síntesis de proteína y la eventual muerte celular después de 2-4 días.

Más específicamente, células fueron diluidas a 5×10^4 células/ml en un medio de cultivo de células. Se agregaron 50 μl de células diluidas a cada receptáculo de una placa de cultivo de tejidos de 96 receptáculos de fondo plano y se incubaron durante la noche en una incubadora de CO_2 al 5 % a 37 $^{\circ}\text{C}$. Los anticuerpos se diluyeron con un medio de cultivo hasta una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se agregaron 25 μl de anticuerpo diluido a las células de cultivo de manera que las concentraciones finales de anticuerpo fueron de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se incubaron células de anticuerpos durante 10 minutos antes de agregar 25 μl de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de reactivo Hum-zap. La mezcla se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 durante 72 horas. Se agregaron 100 μl de Celltiter-Glo (un tinte de viabilidad) a cada receptáculo y se revolviaron suavemente durante 2 minutos. Al cabo de 10 minutos a temperatura ambiente, se leyeron las placas en un Promega Veritas Microplate Luminator.

El ensayo Hum-ZAP se llevó a cabo usando las líneas celulares que expresan mesotelina NCI-H226, CFPAC-1 y KB (descritas en el Ejemplo 3) como células diana, así como también en células CHO transfectadas para expresar mesotelina en la superficie celular a través de un enlace GPI (CHO-mesotelina). Los resultados se expresan cualitativamente a continuación en la Tabla 5.

Anticuerpo	CHO-Mesotelina	NCI-H226	CFPAC-1	KB
3C10	+	N.D	N.D	+
6A4	+	+	+	+
7B1	+	N.D	N.D	+/-
N.D. = No determinado				

Los resultados del ensayo Hum-ZAP demuestran que el anticuerpo 6A4 fue internalizado mediante todas las cuatro líneas de células. Los anticuerpos 3C10 y 7B1 fueron también internalizados mediante células de CHO-mesotelina. Aún más, el anticuerpo 3C10 fue internalizado mediante células KB, mientras que el anticuerpo 7B1 no fue tan bien internalizado por las células KB como lo fueron los otros dos anticuerpos.

En la segunda serie de análisis, la internalización del anticuerpo 6A4 mediante la línea celular NCI-H226 fue examinada adicionalmente usando un ensayo de inmunofluorescencia. En este ensayo, se cultivaron NCI-H226 hasta una confluencia del 80 %. Las células adherentes fueron levantadas con un buffer de disociación de células (Cell Stripper) y $1,35 \times 10^6$ células fueron transferidas a un tubo cónico de 15 ml y se lavaron una vez con buffer FACS (PBS + 2 % de suero bovino fetal). Las células se incubaron con un anticuerpo 6A4 a 20 µg/ml en un volumen de 450 µL de buffer FACS (PBS + 2 % de suero bovino fetal) a 4 °C durante 30 min seguido de lavado con buffer FACS frío. Luego las células fueron teñidas con un anticuerpo de detección, un anticuerpo IgG anti-humano de cabra, conjugado con Rodamina a 20 µg/ml en un buffer FACS a 4 °C durante 30 minutos, seguido de lavado con buffer FACS frío. Este complejo receptor/anticuerpo fue suspendido adicionalmente en 450 µL de buffer FACS y se incubó con las células a 37 °C/5 % de CO₂ por tiempos especificados (cero, 5, 10, 15, 30, 60, 120 minutos, y durante la noche) para permitir la internalización. En puntos de tiempo especificados, alícuotas de 50 µL, que correspondían a 150.000 células, fueron transferidas a placas de 96 receptáculos, y se teñieron con un conjugado de aglutinina de germen de trigo-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Cat. #W11261), que tiñe la superficie de las células. Se incubaron alícuotas de células en hielo durante 30 minutos con 10 µg/ml de WGA e un buffer FACS, seguido de lavado con buffer FACS. Finalmente, las células se lavaron con buffer FACS y se fijaron por adición de 2 % de paraformaldehído y se analizaron por microscopía de fluorescencia para determinar la inmunofluorescencia asociada usando longitudes de onda de excitación/emisión de 495/519 y 554/570 para Alexa 488 y Rodamina respectivamente. Los resultados confirmaron que el mAb 6A4 es efectivamente internalizado por las células NCI-H226.

Ejemplo 6: Inhibición de Adhesión de Mesotelina a CA125 con mAbs anti-mesotelina

Para ensayar la capacidad de los anticuerpos anti-mesotelina para inhibir la adhesión de mesotelina a CA125, se llevó a cabo un ensayo heterotípico de adhesión de células *in vitro*. En este ensayo, se examinó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la adhesión de células OVCAR3 (una línea de células de cáncer de ovario que expresa CA125) a células CHO transfectadas para expresar mesotelina en su superficie celular (CHO-mesotelina). La adhesión de células OVCAR3 (descritas adicionalmente en el Ejemplo 3) a células de CHO-mesotelina es intermediada por la interacción de mesotelina con CA125.

Para ensayar la inhibición de anticuerpo de la interacción de mesotelina /CA125, se depositaron células OVCAR en una densidad de 4×10^4 células/200 µl por receptáculo en una placa de 96 receptáculos durante 24 horas antes del ensayo para obtener un cultivo de células sub-confluyente. Después de 24 horas, se extrajo el medio y se agregó a los receptáculos un medio fresco que contenía 1 % de albúmina de suero bovino (BSA) además de 10 µg/ml de anticuerpo (3C10, 7B1, 6A4, control de isotipo o ningún anticuerpo), a los receptáculos. Las células fueron incubadas a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 30 minutos. Células CHO-S (células parentales) y células de CHO-Mesotelina fueron incubadas durante 30 minutos con Calceina AM (5 µM durante 6×10^6 células/ml), se lavaron con el medio y se agregaron a los cultivos de OVCAR y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C.

A continuación de la incubación, las muestras se lavaron cuatro veces con PBS para remover las células no adheridas. Se midieron las células adheridas agregando 100 µl/receptáculo de PBS y placas lectoras con el lector Synergy-HT Fluorescence a 494nm/517nm.

Los resultados se ilustran en la Figura 8. Los resultados muestran que las células OVCAR3 se adhirieron a células de CHO-mesotelina en ausencia de anticuerpos, pero no se adhirieron a las células CHO-S de control que no expresaban mesotelina en su superficie celular. Además, la presencia del mAb 3C10 o el mAb 6A4 dió como resultado una inhibición de aproximadamente 68,7 % o una inhibición del 84,8 %, respectivamente, en la adhesión de células, en comparación con un anticuerpo de control (DT). En cambio, el mAb 7B1 no exhibió la capacidad de inhibir la interacción de mesotelina con CA125, lo cual indica que el epítipo al cual se adhiere 7B1 en la mesotelina (que difiere de los epítipos 3C10 y 6A4) no bloquea la región de interacción de mesotelina CA125.

Ejemplo 7: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos

Para determinar la capacidad del anticuerpo 6A4 para matar células que expresen mesotelina en presencia de células efectoras a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), se usó un ensayo de citotoxicidad de

fluorescencia. Las células CHO transfectadas para expresar una porción asociada a membrana de 40kD de mesotelina en su superficie celular (células CHO–mesotelina) fueron utilizadas como células diana.

5 Se preparon células efectoras humanas a partir de sangre completa de la manera siguiente. Células mononucleares de sangre periférica fueron purificados a partir de sangre entera heparinizada mediante separación standard Ficoll–paque. Las células fueron resuspendidas en un medio RPMI1640 que contenía 10 % de FBS (inactivado por calor) y 200 U/ml de IL–2 humana y se incubaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se recogieron las células y se lavaron cuatro veces en un medio de cultivo y se resuspendieron a razón de 2×10^7 células/ml. Se preparon células de CHO–mesotelina diana incubando con reactivo BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5 µl de BATDA por 1×10^6 células diana/ml durante 20 minutos a 37° C. Las células diana fueron lavadas cuatro veces, se revolvieron y se llevaron a un volumen final de 1×10^5 células/ml.

15 Las células de CHO–mesotelina se ensayaron para el ADCC específico de anticuerpo, para anticuerpo monoclonal 6A4 anti–mesotelina humana usando los análisis de emisión de fluorescencia Delfia de la manera siguiente: células de CHO–mesotelina (100 µl de células diana rotuladas, 10^4 células/receptáculos) se incubaron con 50 µl de células efectoras (10^6 células/receptáculos) y 50 µl de anticuerpo (10ug/ml de concentración final). Se usó una diana para relación efectora de 1:100 a través de todos los análisis. En todos los estudios, se usó un control de isotipo IgG1 humano como control negativo. Las células se revolvieron a 2000 rpm y se incubaron durante una hora de incubación a 37° C. Los sobrenadantes fueron luego recogidos y sometidos a centrifugación y se transfirieron 20 µl de sobrenadante a una placa de fondo plano a la cual se habían agregado 180 µl de solución Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se leyeron en un lector RubyStar (BMG Labtech). El porcentaje de lisis se calculó de la manera siguiente: (liberación de muestra – liberación espontánea * 100) / (liberación máxima – liberación espontánea), donde la liberación espontánea es la fluorescencia de los receptáculos que contienen las células efectoras más las células diana y una liberación máxima es la fluorescencia de los receptáculos que contienen células diana y que han sido tratados con 2 % de Triton–X.

Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 6, que muestra la CE_{50} en nM.

Tabla 6: Citotoxicidad Celular dependiente de Anticuerpo Intermediada por el Anticuerpo 6A4	
Anticuerpo	CE_{50} (nM)
6A4	63,10
Control de Isotipo	682,7

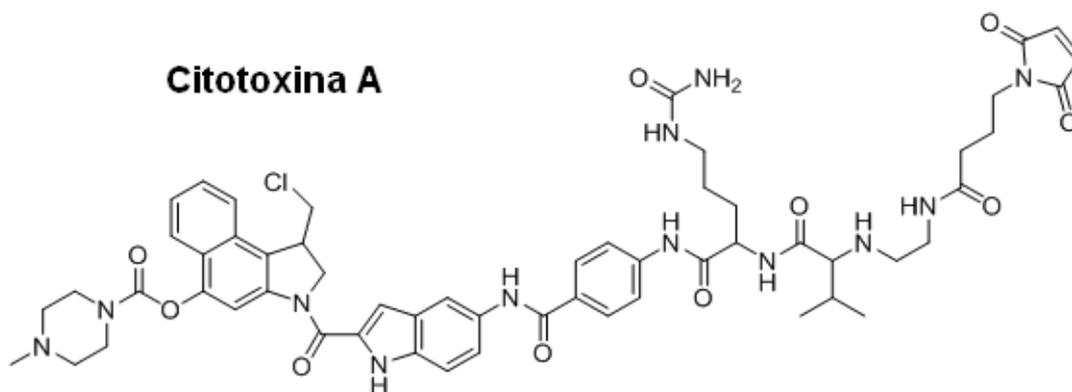
30 Los resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal 6A4 exhibe actividad ADCC contra una línea celular que expresa mesotelina en su superficie celular.

Ejemplo 8: Inhibición del Crecimiento Tumoral *In Vivo* Mediante Anti–Mesotelina mAb 6A4

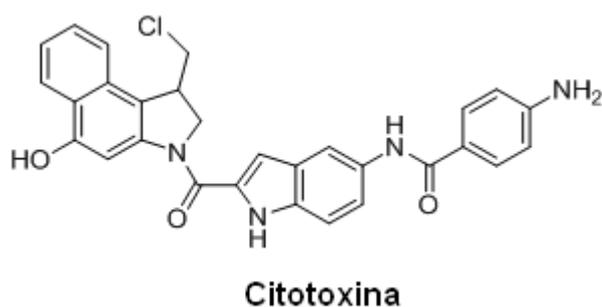
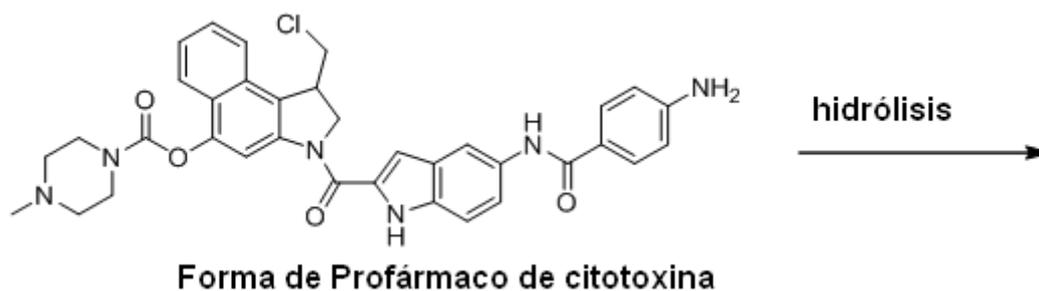
35 En este ejemplo, se examinó la capacidad del mAb 6A4, ya sea como anticuerpo desnudo o como conjugado de citotoxina para inhibir el crecimiento del tumor en modelos de ratón *in vivo*. El conjugado de citotoxina 6A4 se denomina aquí 6A4–Citotoxina A, y está compuesto por el anticuerpo 6A4 ligado a Citotoxina A. La citotoxina de Citotoxina A y sus preparaciones se describió adicionalmente en la WO 2008/083312, cuyo contenido se incorpora específicamente aquí como referencia. El conjugado 6A4–Citotoxina A se preparó de la manera siguiente:

40 Se concentró el anticuerpo 6A4 hasta aproximadamente 5 mg/ml, se intercambió el buffer en 100 mM de buffer de fosfato, 50 mM de NaCl, 2 mM DTPA pH 8.0 y se tioló por adición de un exceso molar de 8 a 10 veces de 2–Inminotiolano durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación de la tiolación, el anticuerpo se sometió a un intercambio de buffer en 50 mM de HEPES, que contenía 5 mM de glicina, 2 mM de DTPA, y 0.5 % de Povidona (10 K) pH 5.5. La tiolación se cuantificó con 4, 4”–ditiodipiridina midiendo la liberación de tiopiridina a 324nM. La conjugación se logró por adición de maleimida que contenía el fármaco citotoxina A a una relación molar de 3:1 de fármaco a tioles. La incubación se efectuó a temperatura ambiente durante 60 minutos seguido de adición de una relación 10:1 molar de *N*–etilmaleimida (NEM) a tioles en la mezcla de reacción. Después de incubación en presencia de NEM, los conjugados resultantes se purificaron por cromatografía de exclusión de tamaño en una columna Sefacryl–200 en 50 mM de HEPES, 5 mM de glicina, 100 mM de NaCl, pH 6.0. Las fracciones que contenían conjugado de anticuerpo monomérico se reunieron y concentraron por ultrafiltración. La concentración de conjugado de anticuerpos y las relaciones de sustitución se determinaron midiendo la absorbancia a 280 y 340 nm.

La citotoxina A tiene la estructura que se da a continuación:



- 5 Los expertos en la materia apreciarán que aunque se emplee el término “citotoxina”, la estructura que se muestra abarca realmente a ambas, la (molécula asociada) apropiada de citotoxina y un resto ligador para unir la citotoxina al anticuerpo y para que, después de la disociación del conjugado, la toxina sea liberada en forma de profármaco el cual es luego hidrolizado a la toxina apropiada. Por lo tanto, hablando en términos estrictos, la molécula asociada en un conjugado de esta invención puede considerarse bajo la forma de profármaco o bajo la citotoxina apropiada.



- 10 En una serie de análisis, se examinó el efecto de 6A4 y 6A4–Citotoxina A sobre el desarrollo de células NCI–H226 (mesotelioma derivado de pulmón; ATCC Designación CRL–5826) en un modelo de xenoinjerto de ratón. En este modelo de xenoinjerto, ratones SCID (CB17, de Taconic, Germantown, NY) fueron implantados con 9×10^6 células de NCI–H226 / ratón y las células NCI–H226 se dejaron desarrollar durante 36 días. En el día 40, momento en el cual el volumen del tumor era de 87 mm^3 , los ratones fueron distribuidos aleatoriamente y se trataron intraperitonealmente (i.p.) con 6A4 (10 mg/kg o 30 mg/kg) o con un conjugado de 6A4–Citotoxina A (0.1 $\mu\text{mol/kg}$), junto con los controles: vehículo solo (PBS, Q3Dx4), un anticuerpo IgG1 humano emparejado con isotipo (4A3) o un anticuerpo IgG1 humano emparejado con isotipo con la citotoxina (citotoxina A) (iso–Citotoxin A).

- 20 El anticuerpo 6A4, y sus controles, fueron administrados en los días 40, 43, 47 y 51. El conjugado de 6A4–Citotoxina A y sus controles, fueron administrados en los días 40 y 64. Se midió el volumen del tumor a intervalos regulares hasta el día 105. Las Figuras 9A y 9B muestran el volumen promedio del tumor y la mediana del volumen del tumor respectivamente en ratones tratados con vehículos solamente. 6A4–Citotoxina A (0.1 $\mu\text{mol/kg}$), iso–Citotoxina A (0,1 $\mu\text{mol e/kg}$), 6A4 no conjugado y control de isotipo no conjugado (4A3). Tal como podría esperarse, dado que el modelo de xenoinjerto de ratón empleado en el presente estudio está inmuno–comprometido y por lo tanto no se esperaba que montara una fuerte respuesta de ADCC, el tratamiento con el anticuerpo 6A4 desnudo no muestra un efecto sobre el volumen de la célula tumoral NCI–H226 (es decir, no inhibe el crecimiento del tumor). En cambio, el

tratamiento con el conjugado A de 6A4–Citotoxin A inhibió significativamente el crecimiento del tumor tal como se ilustra en los gráficos de las Figuras 9A y 9B.

5 En una segunda serie de análisis, se examinó el efecto de 6A4 y 6A4–Citotoxin A sobre el crecimiento de células HPAC (adenocarcinoma pancreático humano; ATCC Designación CRL–2119) en un modelo de xenoinjerto de ratón. Se implantaron células HPAC (5×10^6 células/ratón) en ratones CB17 SCID y se dejaron crecer durante 8 días. En el día 8, momento en el cual el volumen promedio del tumor era de 96 mm^3 , los ratones fueron distribuidos aleatoriamente y se trataron intraperitonealmente (i.p.) con 6A4 (10 mg/kg o 30 mg/kg) o con un conjugado de 6A4–Citotoxina A (0.15 $\mu\text{mol/kg}$), junto con controles: vehículo solo (PBS, Q3Dx4), un anticuerpo IgG1 humano emparejado con isotipo (4A3; 30 mg/kg) o un anticuerpo IgG1 humano emparejado con isotipo ligado a la citotoxina de Citotoxina A (2A10–Citotoxina A; 0.15 $\mu\text{mol/kg}$) y 6A4 no conjugado (8 mg/kg) o control de isotipo no conjugado (2A10; 8.7 mg/kg, SD) a dosis de proteína equivalentes. El anticuerpo 6A4 y sus controles se administraron con un programa de dosis de Q3Dx4 (cada tres días por cuatro veces). El conjugado 6A4–Citotoxina A, y sus controles, se administraron con un programa de dosis única (SD). El volumen del tumor se midió a intervalos regulares hasta el día 57.

15 Los resultados se muestran en los gráficos de las Figuras 10A y 10B. Las Figuras 10A y 10B muestran el volumen promedio del tumor y la mediana del volumen del tumor respectivamente en ratones tratados con vehículos solamente, 6A4–Citotoxina A (0.15 $\mu\text{mol/kg}$), conjugado emparejado con isotipo (2A10–Citotoxina A; 0.15 $\mu\text{mol/kg}$), 20 6A4 no conjugado equivalente en peso (8 mg/kg), control de isotipo no conjugado (2A10; 8.7 mg/kg) en dosis de proteína equivalentes, 6A4 desnudo (10 mg/kg o 30 mg/kg) o mAb desnudo y IgG1 apareado con isotipo (4A3; 30 mg/kg). Los datos indican que el tratamiento con el anticuerpo 6A4 desnudo dio como resultado una inhibición del crecimiento de las células tumorales HPAC, incluso a pesar de que el modelo de xenoinjerto de ratón no se supondría que montaría una fuerte respuesta de ADCC. Nuevamente, tal como sucedió con el ejemplo previo, el tratamiento con conjugado de 6A4–Citotoxina A demostró que era muy eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales HPAC.

25 En una tercera serie de análisis, se examinó el efecto de 6A4–Citotoxina A sobre el crecimiento de células OVCAR3 derivadas de cáncer de ovario (ATCC Designación HTB–161) en un modelo de xenoinjerto de ratón. En este modelo de xenoinjerto, ratones CB17 SCID fueron implantados con 5×10^6 células OVCAR3 por ratón y las células OVCAR3 se dejaron desarrollar durante 42 días. En el día 42, el promedio de volumen del tumor era de aproximadamente 100 mm^3 . Los ratones se trataron intraperitonealmente (ip), con un conjugado de 6A4–Citotoxina A en una dosis de 0,1 o 0,3 $\mu\text{mole/kg}$. Como controles, los ratones se trataron con vehículos solamente, (PBS, Q3Dx4) o con 0,1 o 0,3 $\mu\text{mole/kg}$ de un anticuerpo IgG1 humano emparejado con isotipo ligado con citotoxina A.

30 El conjugado de 6A4–Citotoxina A y sus controles fueron administrados en los días 42, 96, 132 y 176. Tal como se muestra en la Figura 11, el tratamiento con el conjugado de 6A4–Citotoxina A inhibió significativamente el crecimiento del tumor. El crecimiento del tumor fue controlado a través de todo este ejemplo, incluyendo hasta la dosificación final en el día 176, para la dosis de 0.3 $\mu\text{mol/kg}$ de 6A4–Citotoxina A. El crecimiento del tumor se controló hasta el día 150 con la dosis de 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ de 6A4–Citotoxina A. Los controles de isotipo no fueron eficaces para controlar los tumores (no se muestran datos).

35 Resumiendo, un conjugado citotóxico de anticuerpo 6A4 (en una dosis de 0.1–0.15 $\mu\text{mol/kg}$) inhibió significativamente el crecimiento del tumor in vivo en tres modelos diferentes de xenoinjerto de ratón

40 **Ejemplo 9: ADCC Intermediado por 6A4 No –fucosilado**

En este ejemplo, anticuerpos 6A4 no fucosilados (6A4nf) demostraron que eran eficientes mediadores de ADCC en cánceres de pulmón y ovario. Un análisis de emisión de fluorescencia Delfia demostró que el 6A4 no fucosilado mató las células de OVCAR3 (cáncer de ovario) y H226 (NSCLC) que expresan mesotelina en presencia de células efectoras a través de ADCC. Primero, se prepararon células efectoras humanas a partir de sangre entera de la manera siguiente: células mononucleares de sangre periférica humana fueron purificadas a partir de sangre entera heparinizada mediante separación standard de Ficoll–paque. Las células se resuspendieron en medios de RPMI1640 que contenían 10 % de FBS (inactivado por calor) y 200 U/ml de IL–2 humano y se incubaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las células fueron recogidas y lavadas cuatro veces en medios de cultivo y se resuspendieron a razón de 2×10^7 células/ml.

55 En segundo lugar, se prepararon células H226 o OVCAR3 rotuladas incubándolas con un reactivo BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA). En tercer lugar, se mezclaron las células diana con células efectoras de anticuerpo. Se incubaron 100 μl de células diana rotuladas (10^4 células/receptáculo) con 50 μl de células efectoras (10^6 células/receptáculo) y 50 μl de anticuerpo (10 $\mu\text{g/ml}$ de concentración final) Se usó a través de todos los análisis una diana para una relación efectora de 1:100. Se usó un control de isotipo IgG1 humano (HuIgG1) como control negativo. En cuarto lugar se cuantificó la lisis celular. Las células fueron sometidas a revoluciones a 2000 rpm y se incubaron durante una incubación de una hora a 37° C. Luego se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a centrifugación y se transfirieron 20 μl de sobrenadante a una placa de fondo plano. Se agregaron 180 μl de solución Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se leyeron en un lector RubyStar (BMG Labtech). El porcentaje de lisis se calculó

de la manera siguiente: (liberación de muestras – liberación espontánea) x 100) dividido por (liberación máxima – liberación espontánea), donde la liberación espontánea es la fluorescencia de receptáculos que contienen células diana además de células efectoras y la liberación máxima es la fluorescencia de receptáculos que contienen células diana y que han sido tratadas con 2 % de Triton X. Se observaron aumentos significativos en la actividad de ADCC usando 6A4 no fucosilados sobre células OVCAR3 (Figura 12a) y células H226 (Figura 12b).

Ejemplo 10: 6A4 No fucosilado Inhibió el crecimiento del Tumor *in vivo*

En otro ejemplo, 6A4nf, en combinación con Gemcitabina, hizo significativamente más lento el crecimiento de células H226 en un modelo de injerto de ratón. Se implantaron ratones SCID CB17 con 9×10^6 células H226 por ratón y se dejaron crecer. En el día 23, el volumen promedio del tumor fue de aproximadamente 100 mm³. Los ratones fueron distribuidos al azar y se trataron intraperitonealmente con 6A4nf, 80 mg/kg de Gemcitabina, la combinación de 6A4nf más Gemcitabina, un vehículo de control, o un isotipo IgG1 de control. Se administró 6A4nf a cualquiera de 10 mg/kg o 30 mg/kg. Se inhibió el crecimiento de H226 mediante todas las combinaciones de 6A4nf más Gemcitabina. Se logró la inhibición máxima cuando se administró 6A4nf a 30 mg/kg en combinación con Gemcitabina y se sugirió un efecto dependiente de la dosis.

Ejemplo 11: Expresión de Mesotelina en Células Tumoraes

Se usó inmunohistoquímica usando el anticuerpo 6A4 para mostrar su capacidad para adherirse a tumores humanos y determinar el rango de expresión de mesotelina en tumores. 6A4 fue pre-complejado con un Fab anti-cabra rotulado con FITC (Jackson # 109-097-003) de manera que la concentración final de 6A4 fuera de 6µg/ml. Este complejo se usó luego con métodos IHC standard para determinar la adhesión. Se demostró que 6A4 se adhería a cánceres de ovario, cánceres pancreáticos, cánceres de pulmón, mesoteliomas, y cánceres de la cabeza y cuello. Ejemplos adicionales de adhesión de 6A4 a cánceres de cabeza y cuello incluyen cánceres de epiglotis, laringe, glándulas salivales, lengua, y tejidos de las amígdalas.

Ejemplo 12: 6A4-Citotoxina A no es Tóxica en Monos Macacos

6A4-Citotoxina A demostró que no era tóxica en monos macacos. Estos animales muestran patrones de expresión de mesotelina similares a los de los seres humanos. Además, el anticuerpo 6A4 se adhiere a la proteína mesotelina de los macacos con la misma afinidad con la que lo hace a la proteína mesotelina humana. Por lo tanto, los monos macacos son apropiados para verificar las toxicidades diana de 6A4-Citotoxina A.

La 6A4-Citotoxina A se dosificó intravenosamente para dos macacos macho y dos hembras. Se administraron dos dosis de 0.4 µmol/kg en los días 1 y 15. Se observó a los animales para determinar los cambios de comportamiento, los signos de toxicidad y se extrajo sangre para análisis. Los animales no mostraron signos de efectos tóxicos.

En los días 4, 3, 7, 14, 21, y 28, se extrajo sangre y se midieron parámetros múltiples. No se observó ningún cambio significativo en los leucocitos, eritrocitos, plaquetas, reticulocitos, porcentajes de neutrófilos, porcentajes de linfocitos, porcentaje de monocitos, porcentajes de eosinófilos, porcentajes de basófilos, porcentajes de células sin tinción, hemoglobina, hematocritos, mcv, mch, mchc, protime, apt, albúmina, proteína total, globulina, bilirrubina, urea-nitrógeno, creatinina, fosfatasa alcalina, alanina transferasa, aspartato transferasa, glutamil transferasa, glucosa, colesterol, calcio, cloruro, fósforo, potasio, sodio y triglicéridos.

Después de la necropsia en el día 28, no se observaron cambios relacionados con los fármacos en los siguientes órganos: glándulas adrenérgicas, aorta, esternón, cerebro, ciego, colon, duodeno, esófago, ojos, nervio óptico, fémur, vesícula, corazón, ileón, yeyuno, riñones, nódulo linfático, hígado, nódulo linfático, mes, pulmones, glándula mamaria, nervio ciático, ovarios, páncreas, pituitaria, paratiroide, recto, glándula salival, piel, músculo esquelético, bazo, estómago, glándulas tiroideas, timo, médula espinal, tráquea, tejido urinario, útero, vagina, cuello uterino, sitio de inyección, oviductos, uretra y parches Peyrer.

RESUMEN DEL LISTADO DE SECUENCIAS			
SEQ ID NO:	SECUENCIA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	V _H CDR1 a.a. 3C10	25	V _H n.t. 3C10
2	V _H CDR1 a.a. 6A4	26	V _H n.t. 6A4
3	V _H CDR1 a.a. 7B1	27	V _H n.t. 7B1
4	V _H CDR2 a.a. 3C10	28	V _K n.t. 3C10
5	V _H CDR2 a.a. 6A4	29	V _K n.t. 6A4
6	V _H CDR2 a.a. 7B1	30	V _K n.t. 7B1
7	V _H CDR3 a.a. 3C10	31	V _H 3-33 línea germinal a.a.
8	V _H CDR3 a.a. 6A4	32	V _H 3-7 línea germinal a.a.
9	V _H CDR3 a.a. 7B1	33	V _K L6 línea germinal a.a.
10	V _K CDR1 a.a. 3C10	34	V _K A27 línea germinal a.a.

ES 2 526 355 T3

11	V _K CDR1 a.a. 6A4	35	3C10 Fragmento VH presentado en Fig. 4
12	V _K CDR1 a.a. 7B1	36	6A4 Fragmento VH presentado en Fig. 4
13	V _K CDR2 a.a. 3C10	37	JK4 Fragmento presentado en Fig. 5
14	V _K CDR2 a.a. 6A4	38	JH6b Fragmento presentado en Fig. 6
15	V _K CDR2 a.a. 7B1	39	JK2 Fragmento presentado en Fig. 7
16	V _K CDR3 a.a. 3C10	40	Secuencia de Peptido conjugado
17	V _K CDR3 a.a. 6A4	41	Secuencia de Peptido conjugado
18	V _K CDR3 a.a. 7B1	42	Secuencia de Peptido conjugado
19	V _H a.a. 3C10	43	Secuencia de Peptido conjugado
20	V _H a.a. 6A4		
21	V _H a.a. 7B1		
22	V _K a.a. 3C10		
23	V _K a.a. 6A4		
24	V _K a.a. 7B1		

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Medarex Inc. Terrett, Jonathan A. Pogue, Sarah L. Toy, Kristopher Yang, Lan Rao-Naik, Chetana Chen, Bingliang
- <120> ANTIGUERPOS HUMANOS QUE SE ADHIEREN A MESOTELINA, Y USOS DE LOS MISMOS
- 10 <130> 0192PC
- <140> WO 00/000000
<141> 2008-10-01
- 15 <150> US 60/976626
<151> 2007-10-01
- <150> US 60/991.692
<151> 30-11-2007
- 20 <150> US 61/077.397
<151> 01-07-2008
- <160> 43
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 5
<212> PRT
- 30 <213> Homo sapiens
- <400> 1
- Ile Tyr Gly Met His
1 5
- 35 <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 40 <400>2

ES 2 526 355 T3

Ile Tyr Gly Met His
1 5

<210>3 <211>5 <212> PRT <213> Homo sapiens

5 <400> 3

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

10 <210>4
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 4

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser His Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20 <210>5
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Leu Trp Tyr Asp Gly Ser His Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

25

Gly

30 <210>6
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 6

Ser Ile Lys Gln Ala Gly Ser Glu Lys Thr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400>7

Asp Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

50 <210> 8
<211> 13
<212> PRT

ES 2 526 355 T3

<213> Homo sapiens

<400> 8

5 Asp Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Gly Ala Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ala Ser Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Tyr Ser Met Asp Val
20

15

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

35

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

40

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

45

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

50

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

ES 2 526 355 T3

5 <210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

10 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 15

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

20 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 16

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

30 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

35

40 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Gln Tyr Thr
1 5

45

50 <210> 19
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 526 355 T3

Gln Val Tyr Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser His Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Leu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Pro Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20

ES 2 526 355 T3

Gln Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Thr Phe Arg Ile Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Leu Trp Tyr Asp Gly Ser His Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Pro Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 21
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

ES 2 526 355 T3

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Lys Gln Ala Gly Ser Glu Lys Thr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ala Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ala Ser Tyr Tyr Pro Tyr
 100 105 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 115 120 125

Val Ser Ser
 130

5

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 526 355 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 23
- <211> 107
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 23

ES 2 526 355 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 24
- <211> 108
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 24

ES 2 526 355 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Gln
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 25
- <211> 366
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 25

caggtgtacc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ccgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggaat caccttcagt atctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtca tgaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgctaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggc 300
 gattattatg attcggggag tectcttgac tactggggcc agggaacctt ggtcaccgtc 360

10 tcctca 366

- <210> 26
- <211> 366
- 15 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 526 355 T3

caggtgcacc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cgtctggaat caccttcagg atctatggca tgcactgggt cgcaccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt ttatgggatg atggaagtca tgaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatat attactgtgc gagagatggc 300
 gattactatg attcggggag tcctcttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

5 <210> 27
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 27

gaggttcacc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agatactgga tgagctgggt cgcaccaggct 120
 caagggaaaag ggctggagtg ggtggccagc ataaagcaag ctggaagtga gaaaacctat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtct 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagggagggg 300
 gcatattact atgattcggc gagttattac ccttactact actactacag tatggacgtc 360
 10 tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tca 393

15 <210> 28
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 28

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggcactgg cateccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac ttcggcgga 300
 20 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 29
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 526 355 T3

<400> 29

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcaccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttaactotca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

5 <210> 30
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 30

gtgttgacgc agtctccagg caccctgtct ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc 60
 tgcagggcca gtcagagtgt tagcagcagc tacttagcct ggtaccagca gaaacctggc 120
 caggctccca ggctcctcat ctatggtgca tccagcaggg cactggcat cccagacagg 180
 ttcagtgcca gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagact ggagcctgaa 240
 gattttgcag tgtattactg tcagcagtat ggtagctcac agtacacttt tggccagggg 300
 accaagctgg agatcaaa 318

15 <210> 31
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 31

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

ES 2 526 355 T3

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 32
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 33
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

15

<400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

ES 2 526 355 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 34
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 34

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser
 85 90 95

10

<210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 35

Asp Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Pro Leu
 1 5 10

ES 2 526 355 T3

<400> 41

5 Xaa Leu Ala Leu
1

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de conjugado peptídico

15 <400> 42

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de conjugado peptídico

25 <400> 43

Leu Leu Gly Leu
1

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano que se adhiere a mesotelina humana y comprende:
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 2;
 - (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 5;
 - (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 8;
 - (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 11;
 - (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 14; y
 - (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 17, o
 - (a') una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 3;
 - (b') una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 6;
 - (c') una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 9;
 - (d') una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 12;
 - (e') una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 15; y
 - (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 18.
2. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 2;
 - (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 5;
 - (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 8;
 - (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 11;
 - (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 14; y
 - (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 17.
3. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 3;
 - (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 6;
 - (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 9;
 - (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 12;
 - (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 15; y
 - (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 18.
4. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende:
- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 20; y
 - (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 23.
5. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de las reivindicaciones 1 o 3, que comprende:
- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 21; y
 - (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 24.
6. Una composición que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un conjugado de anticuerpo-molécula asociada que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y una molécula asociada, en donde la molécula asociada es un agente terapéutico que está conjugado con el anticuerpo por un enlazador químico.
8. Un conjugado de anticuerpo-molécula asociada de acuerdo con la reivindicación 7 para uso en el tratamiento de un cáncer **caracterizado por** células que expresan mesotelina.
9. El conjugado de la reivindicación 8 para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer es un mesotelioma, un cáncer pancreático, un cáncer ovárico, un cáncer de estómago, un cáncer de pulmón o un cáncer endometrial.
10. El conjugado de la reivindicación 8 para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesoteliomas, adenocarcinomas de ovario serosos papilares, carcinomas de ovario de células claras, carcinomas de ovario Mulerianos mixtos, carcinomas de ovario mucinosos endometrioides, adenocarcinomas pancreáticos, adenocarcinomas pancreáticos ductales, carcinomas serosos uterinos, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas del conducto biliar extrahepático, adenocarcinomas gástricos,

adenocarcinomas esofágicos, adenocarcinomas colorrectales y adenocarcinomas de mama.

11. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

5

12. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11.

13. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 12.

3C10 VH Anti-Mesotelina

Segmento V: 3-33
 Segmento D: 3-10
 Segmento J: JH4b

```

1      Q V Y L V E S G G G V V Q P G R S L
      CAG GTG TAC CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCC GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     R L S C A A S G I T F S I Y G M H W
      AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA ATC ACC TTC AGT ATC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
      GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    G S H E Y Y A D S V K G R F T I S R
      GGA AGT CAT GAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217    D N S K N T L Y L L M N S L R A E D
      GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CTA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A V Y Y C A R D G D Y Y D S G S P
      ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGC GAT TAT TAT GAT TCG GGG AGT CCT

                                CDR3
                                ~~~~~
325    L D Y W G Q G T L V T V S S
      CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 1A

3C10 VK Anti-Mesotelina

Segmento V: L6
 Segmento J: JK4

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55     A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~
163    A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    R S N W P L T F G G G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 1B

6A4 VH Anti-Mesotelina

Segmento V: 3-33
 Segmento D: 3-10
 Segmento J: JH4b

```

1      Q V H L V E S G G G V V Q P G R S L
      CAG GTG CAC CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     R L S C V A S G I T F R I Y G M H W
      AGA CTC TCC TGT GTA GCG TCT GGA ATC ACC TTC AGG ATC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q A P G K G L E W V A V L W Y D
      GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT TTA TGG TAT GAT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    G S H E Y Y A D S V K G R F T I S R
      GGA AGT CAT GAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217    D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
      GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTA TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A I Y Y C A R D G D Y Y D S G S P
      ACG GCT ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGC GAT TAC TAT GAT TCG GGG AGT CCT

                                CDR3
                                ~~~~~
325    L D Y W G Q G T L V T V S S
      CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 2A

6A4 VK Anti-Mesotelina

Segmento V: L6
 Segmento J: JK4

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55     A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~
163    A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    R S N W P L T F G G G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 2B

7B1 VH Anti-Mesotelina

Segmento V: 3-7
 Segmento D: 3-10
 Segmento J: JH6b

```

1      E V H L V E S G G G L V Q P G G S L
      GAG GTT CAC CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                          CDR1
                                          ~~~~~~
55     R L S C A A S G F T F S R Y W M S W
      AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGA TAC TGG ATG AGC TGG

                                          CDR2
                                          ~~~~~~
109    V R Q A Q G K G L E W V A S I K Q A
      GTC CGC CAG GCT CAA GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC AGC ATA AAG CAA GCT

      CDR2
      ~~~~~~
163    G S E K T Y V D S V K G R F T I S R
      GGA AGT GAG AAA ACC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217    D N A K N S L S L Q M N S L R A E D
      GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TCT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                          CDR3
                                          ~~~~~~
271    T A V Y Y C A R E G A Y Y Y D S A S
      ACG GCT GTT TAT TAC TGT GCG AGG GAG GGG GCA TAT TAC TAT GAT TCG GCG AGT

      CDR3
      ~~~~~~
325    Y Y P Y Y Y Y S M D V W G Q G T T
      TAT TAC CCT TAC TAC TAC TAC AGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

379    V T V S S
      GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 3A

7B1 VK Anti-Mesotelina

Segmento V: A27

Segmento J: JK2

```

      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1   GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      ~~~~~
      R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
                                ~~~~~
      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      ~~~~~
      Q Y G S S Q Y T F G Q G T K L E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CAG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 3B

Regiones 3C10 y 6A4 VH de anti-mesotelina

línea germinal 3-33	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H W	CDR1
3C10 VH	- - Y - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - I - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
6A4 VH	- - H - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - I - - - - - V - - - - - I - - - - - R I - - - - - - - - - - - - - - - - -
línea germinal 3-33	V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R	CDR2
3C10 VH	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - H E - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
6A4 VH	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - H E - - - - - L - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
línea germinal 3-33	D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	CDR3
3C10 VH	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - D G D Y Y D S G S P - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
6A4 VH	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - D G D Y Y D S G S P - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
línea germinal JH4b	D Y W G Q G T L V T V S S	
3C10 VH	L - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	(JH4b)
6A4 VH	L - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	(JH4b)

FIGURA 4

Regiones 3C10 y 6A4 VK de anti-mesotelina

Línea germinal L6	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	<u>CDR1</u>
3C10 VK	- - - - -	- - - - -
6A4 VK	- - - - -	- - - - -
Línea germinal L6	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F	<u>CDR2</u>
3C10 VK	- - - - -	- - - - -
6A4 VK	- - - - -	- - - - -
Línea germinal L6	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N	<u>CDR3</u>
3C10 VK	- - - - -	- - - - -
6A4 VK	- - - - -	- - - - -
Línea germinal L6	W P	
Línea germinal JK4	L T F G G G T K V E I K	
3C10 VK	- - - - -	(JK4)
6A4 VK	- - - - -	(JK4)

FIGURA 5

Región 7B1 VK de anti-mesotelina

Línea germinal A27 7B1 VK	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	<u>CDR1</u>
Línea germinal A27 7B1 VK	S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R	<u>CDR1</u> <u>CDR2</u>
Línea germinal A27 7B1 VK	F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Y G	<u>CDR3</u>
Línea germinal A27 Línea germinal JK2 7B1 VK	S S Y T F G Q G T K L E I K (JK2)	<u>CDR3</u>

FIGURA 7

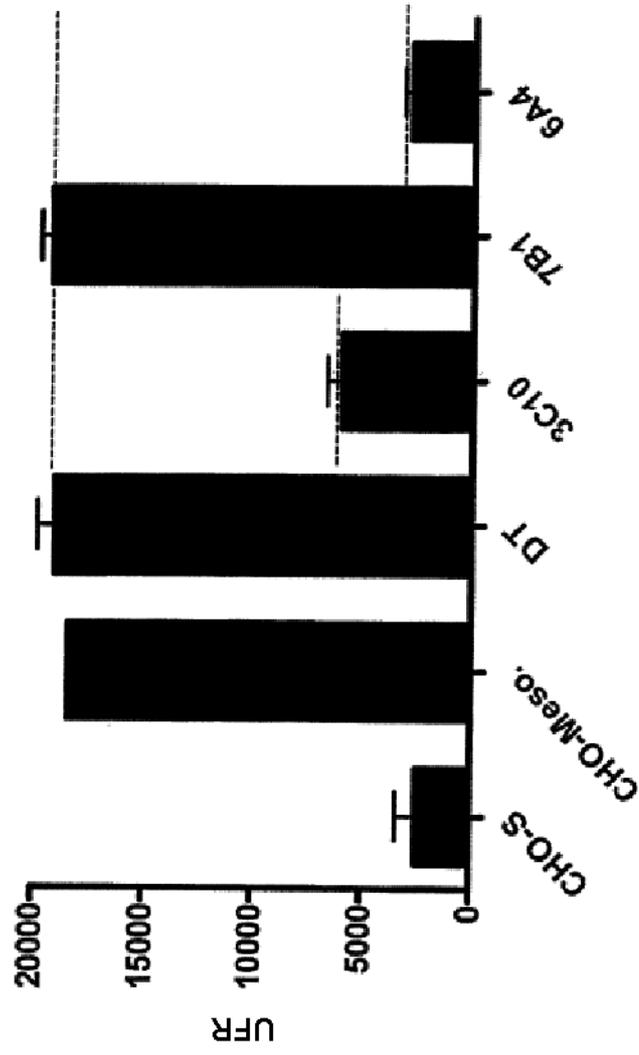


FIGURA 8

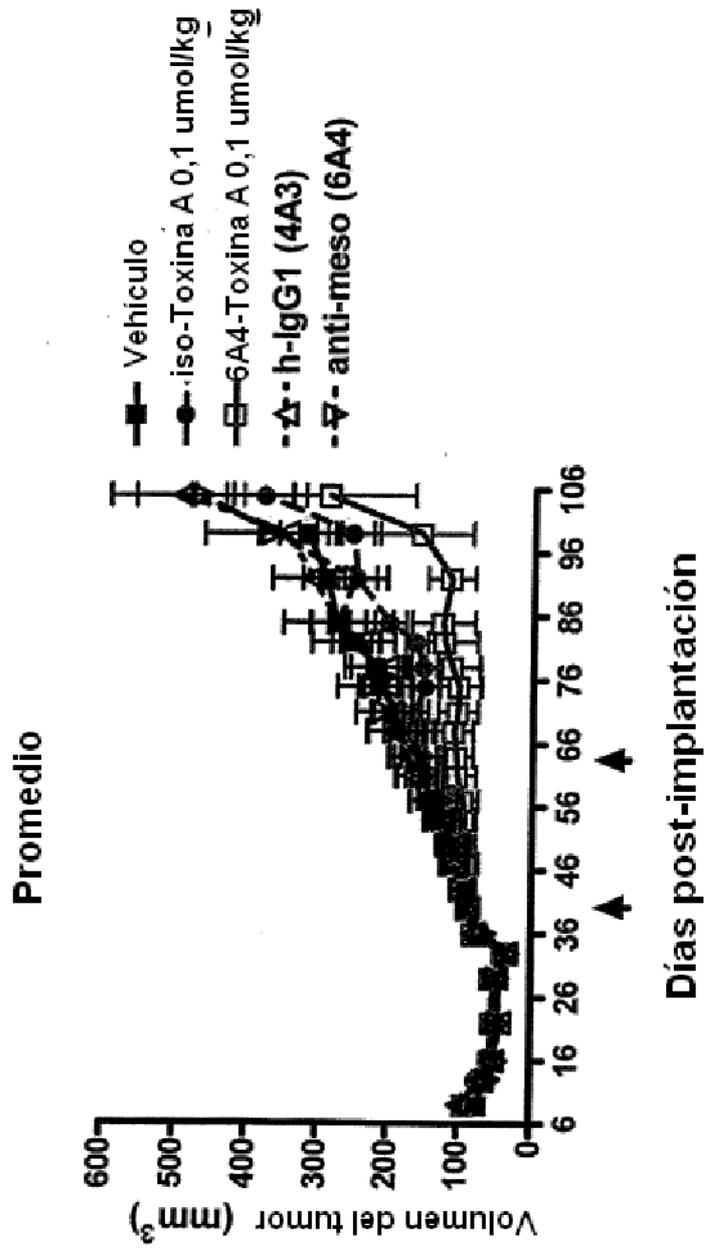


FIGURA 9A

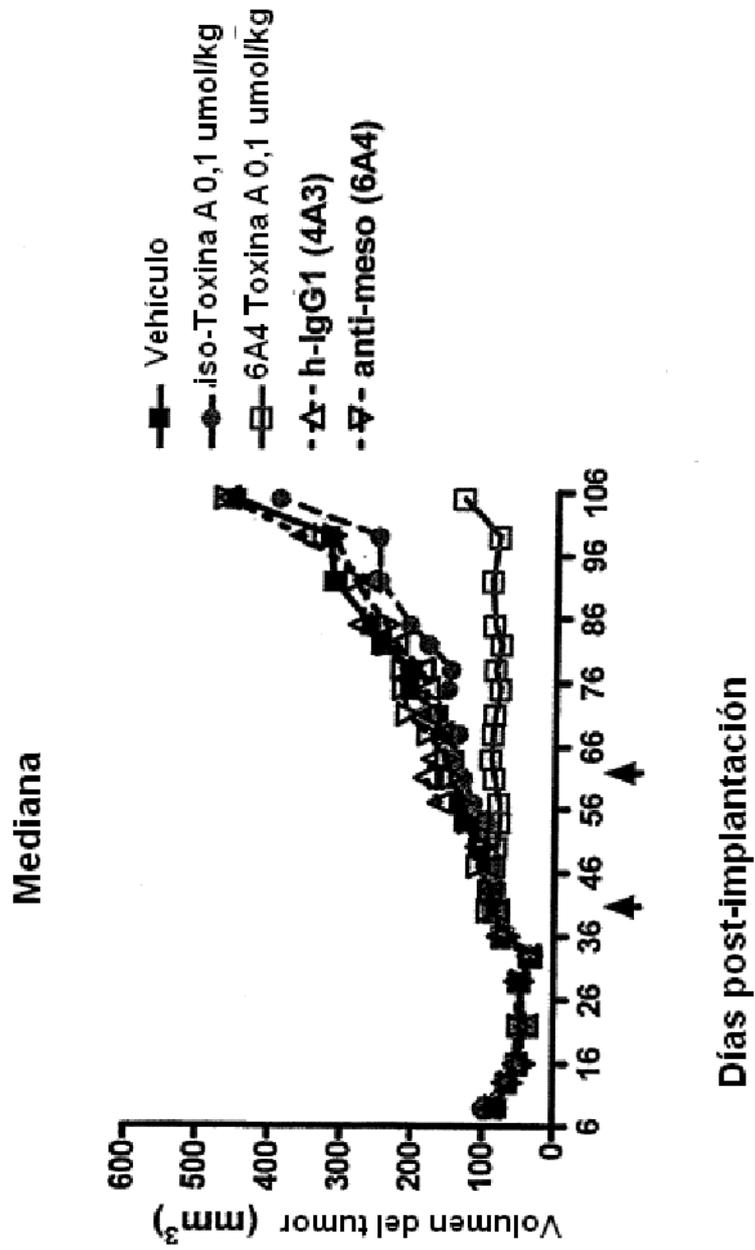


FIGURA 9B

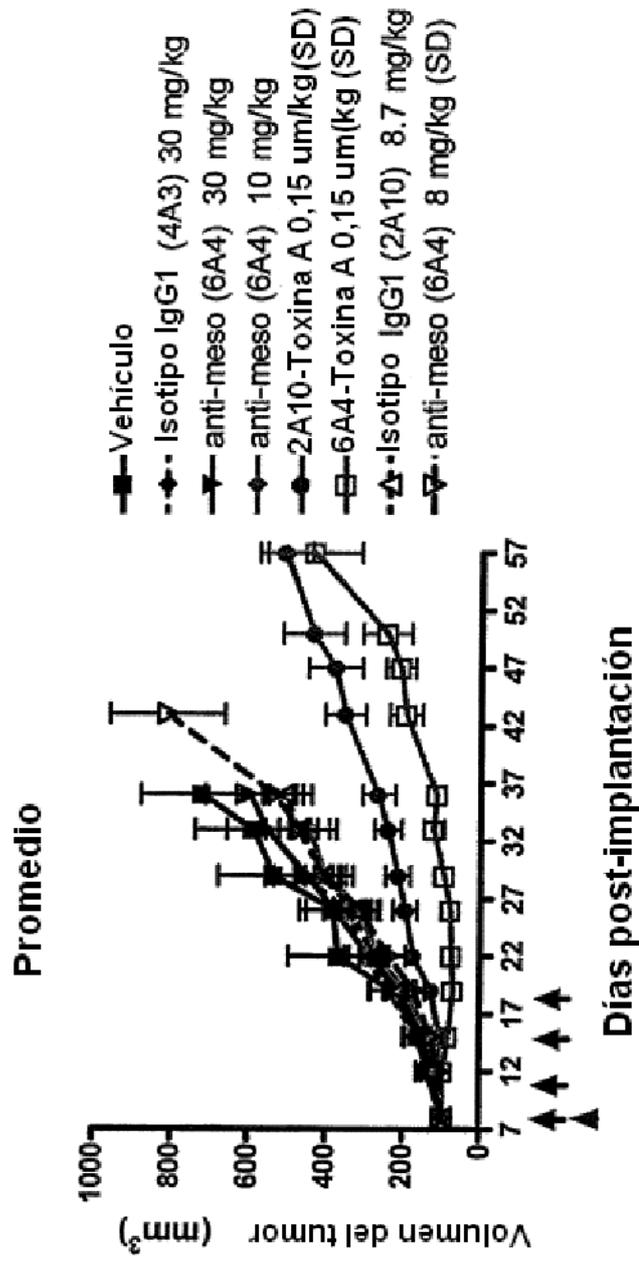


FIGURA 10A

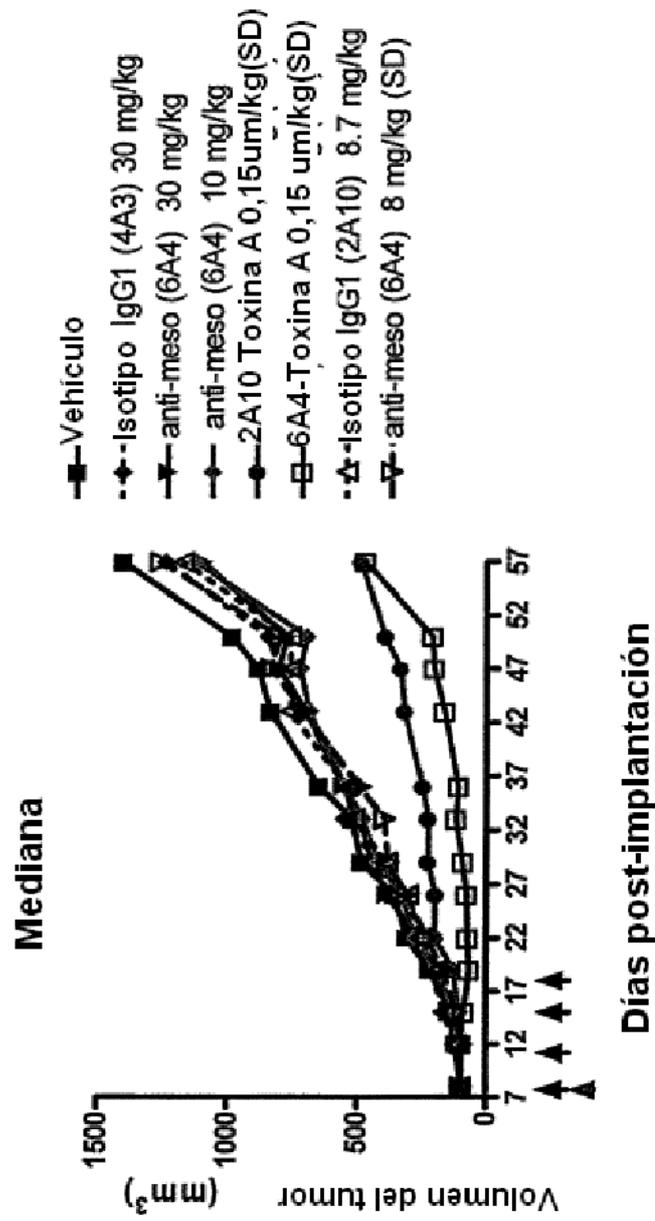


FIGURA 10B

FIGURA 11

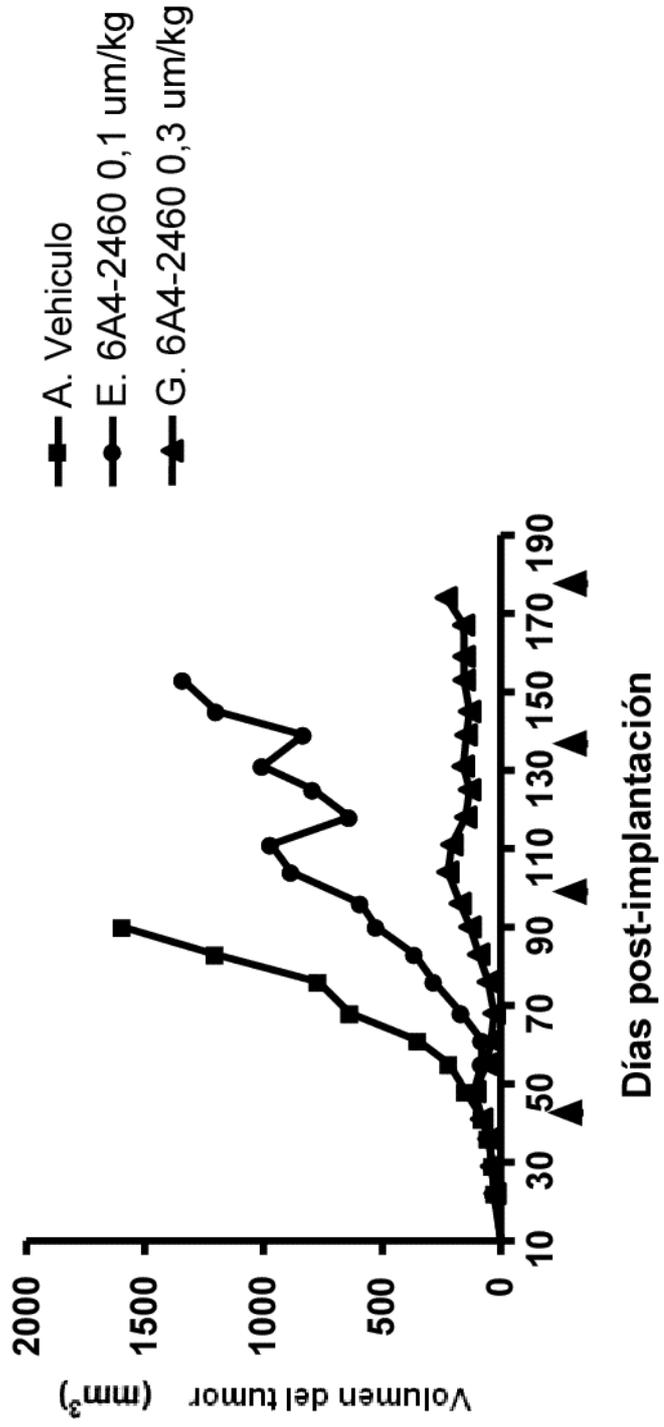


FIGURA 12A

**ADCC: delfia
Células OVCAR3**

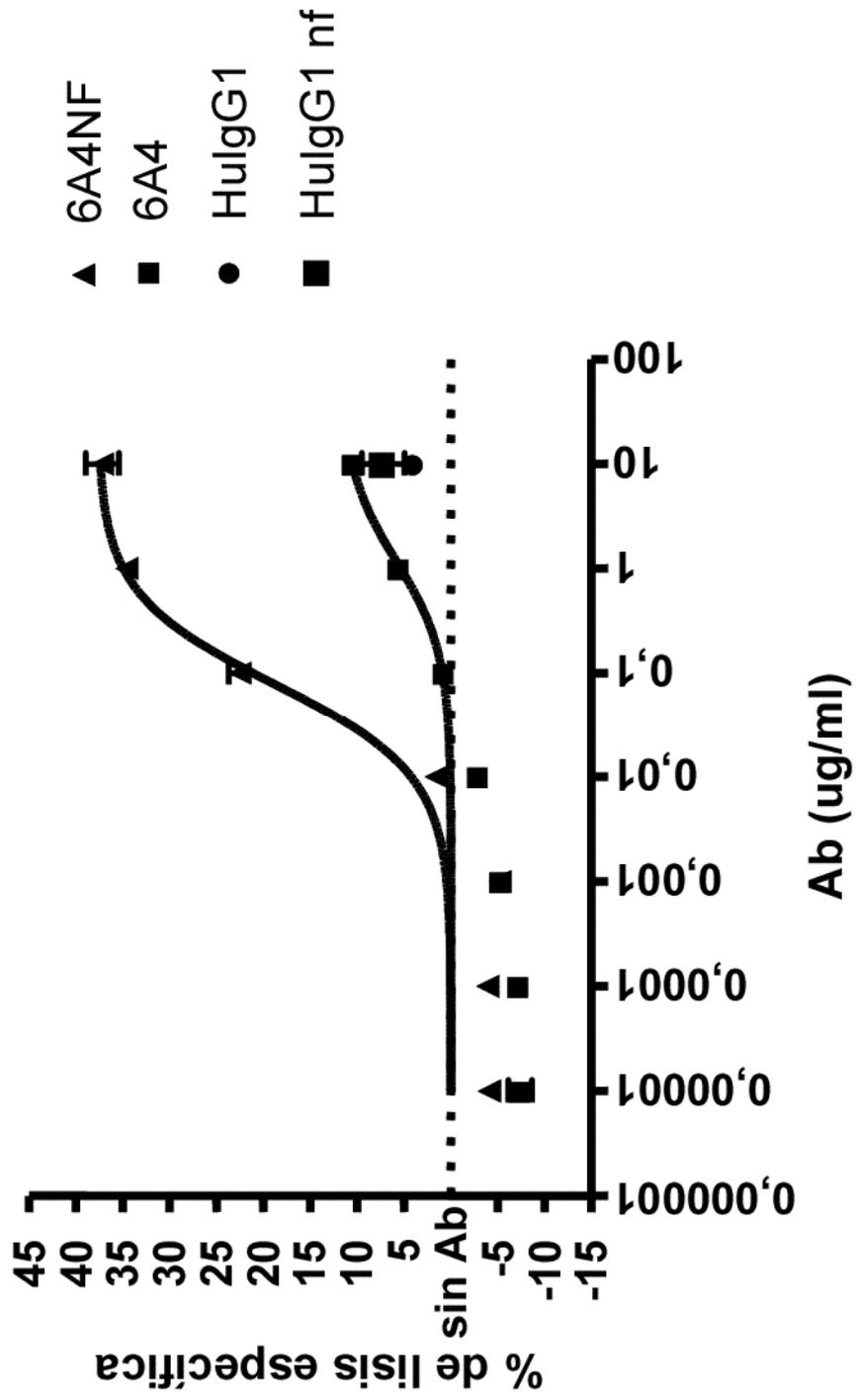


FIGURA 12B

ADCC: delfia

Células H226

