

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 877**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 14/21	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/US2012/036456**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12154530**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12722586 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2704739**

54 Título: **Inmunotoxina recombinante dirigida a mesotelina**

30 Prioridad:

06.05.2011 US 201161483531 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2017

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
6011 Executive Boulevard Suite 325
Rockville, Maryland 20852-3804, US**

72 Inventor/es:

**PASTAN, IRA H.;
WELDON, JOHN y
BEERS, RICHARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 641 877 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

Inmunotoxina recombinante dirigida a mesotelina

Antecedentes de la invención

5 Las inmunotoxinas recombinantes (ITR) son proteínas terapéuticas modificadas por ingeniería genética que combinan un fragmento de anticuerpo con una proteína citotóxica procedente de una fuente bacteriana o vegetal. Las ITR se diseñan como agentes selectivos para la eliminación dirigida de células sin muchas de las toxicidades secundarias asociadas con las estrategias quimioterapéuticas. Para el tratamiento de cánceres pueden construirse ITR fusionando el fragmento variable (Fv) de anticuerpos contra antígenos de superficie celular asociados a tumores, con un fragmento de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE, *Pseudomonas exotoxin*). Las ITR que utilizan un truncamiento de 38 kDa de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38) han obtenido éxitos notables en ensayos clínicos, pero tienen limitaciones que incluyen poca penetración del tumor sólido, alta inmunogenicidad y toxicidades inespecíficas (Kreitman RJ y col., Clin Cancer Res., 15(16):5274-9 (2009); Hassan R y col., Clin Cancer Res., 13(17):5144-9 (2007); Wayne AS y col., Clin Cancer Res., 16(6): 1894-903 (2010); Kreitman RJ y col., J Clin Oncol., 27(18):2983-90 (2009); Sampson JH y col., Neuro Oncol., 10(3):320-9 (2008); Powell DJ Jr y col., J Immunol., 179(7):4919-28 (2007); Kreitman RJ, J Clin Oncol., 23(27):6719-29 (2005); Pal LH y col., Nat Med., 2(3):350-3 (1996)).

En un esfuerzo por mejorar el resultado del tratamiento con las ITR, es importante tener un conocimiento sobre la ruta de intoxicación de PE para entender el diseño de estas proteínas. Las ITR se internalizan a través de endocitosis mediada por receptores y el tránsito a través del sistema endolisosómico al Golgi, donde experimentan transporte retrógrado al retículo endoplásmico (RE). Durante esta fase de tránsito la toxina se activa mediante la reducción de un enlace disulfuro y la escisión por la proteasa furina en un sitio en PE38, que separa el fragmento Fv de PE. Posteriormente, la PE activada debe translocarse al citosol, donde ribosila el ADP e inactiva el factor de elongación 2, un componente esencial del aparato de traducción. Esto detiene la síntesis de proteínas y eventualmente conduce a la muerte celular (para una revisión de la ruta de intoxicación de PE véase 9). Las estrategias previas diseñadas para mejorar la actividad citotóxica de las ITR basadas en PE incluyen la sustitución de los restos C terminales de PE, REDLK (SEQ ID NO: 15), con la señal canónica de retención de RE KDEL (SEQ ID NO: 16) (Seetharam S y col., J Biol Chem., 266 (26): 17376-81 (1991); Du X, Ho M, and Pastan I, J Immunother., 30(6): 607-13 (2007); Rozemuller H. y col., Int J Cancer., 92 (6): 861-70 (2001); Kreitman RJ y Pastan I., Biochem J., 307 (Pt 1): 29-37 (1995)). Se sabe que este cambio potencia la citotoxicidad de PE, presumiblemente mejorando la eficiencia del transporte retrógrado al RE desde el Golgi. Esta estrategia es eficaz, pero normalmente también potencia la toxicidad inespecífica de la ITR. Otra estrategia es potenciar la internalización productiva del complejo ITR-receptor, y por lo tanto aumentar la cantidad de toxina en la célula, mejorando la afinidad entre EL Fv y su diana (Salvatore G y col., Chn Cancer Res., 8(4):995-1002 (2002); Decker T y col., Blood., 103(7):2718-26 (2004)).

Más recientemente, se ha diseñado una ITR resistente a proteasas para soportar la degradación en el sistema endolisosómico, una posible barrera para el tratamiento eficaz de la inmunotoxina (Johannes L and Decaudin D, Gene Ther., 12(18): 1360-8 (2005); Fitzgerald D. Why toxins Semin Cancer Biol., 7(2): 87-95 (1996)). Esta ITR variante "resistente a degradación lisosómica" (LR) se produjo eliminando regiones de PE38 sensibles a proteasa y dirigiéndolas al receptor CD22 de linfocitos B con un Fv anti-CD22 de alta afinidad procedente de la ITR HA22 (Weldon JE, Blood., 113(16): 3792-800 (2009)). La mutación de LR no afectó seriamente la actividad *in vitro* en las líneas celulares, pero redujo enormemente la toxicidad inespecífica en ratones y potenció drásticamente la actividad en células de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) *in vitro*. Adicionalmente, la variante LR elimina dos grupos principales de epítomos de linfocitos B de ratón (Onda M y col., J Immunol., 177(12): 8822-34 (2006)) y sitios de procesamiento de antígeno de PE38, ayudando a reducir su inmunogenicidad en ratones (Hansen JK y col., J Immunother., 33(3): 297-304 (2010)). Debido a la naturaleza modular de las ITR, la variante LR de PE puede dirigirse a otros antígenos asociados a tumores intercambiando un Fv por otro. Por consiguiente, la técnica que desvela la reducción en el dominio II y Ib de PE enseña, en general, las ventajas de eliminar de la molécula sitios antigénicos y sensibles a proteasas. Esta técnica también enseña, en general, las ventajas farmacocinéticas de las ITR más pequeñas resultantes de estos cambios.

Un candidato diana clínicamente importante es la mesotelina antigénica asociada a tumor, que a menudo se expresa en grandes cantidades en cánceres que incluyen mesoteliomas y cánceres del pulmón, ovario y páncreas. La técnica anterior desvela un dsFV específico de mesotelina fusionado a un sitio de escisión de furina y el dominio III de la exotoxina de *Pseudomonas* (WO2009/032954; Weldon y col., 2009, Blood 113(16), p. 3792-3800). Hay una necesidad de ITR mejoradas que se dirijan específicamente a células cancerosas que expresan mesotelina en sus superficies. La presente invención proporciona estas y otras necesidades proporcionando las ITR, composiciones farmacéuticas, y dichas ITR y composiciones farmacéuticas para su uso en los procedimientos de tratamiento para cánceres que expresan o sobreexpresan mesotelina.

Breve resumen de la invención

La presente divulgación proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") mejorada con inmunogenicidad reducida, resistencia mejorada a proteasas lisosomales, y citotoxicidad mejorada para las células que expresan

mesotelina.

La presente invención se refiere a una molécula quimérica que se dirige a la mesotelina que comprende un polipéptido de fusión que tiene la fórmula M-LI-FCS-FL-dominio III funcional de exotoxina de *Pseudomonas* (PE) caracterizado porque el enlazador flexible (FL, del inglés *flexible linker*) consta de 3 a 8 restos de aminoácidos continuos seleccionados independientemente de glicina y serina, en el que

- (a) M es un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento del mismo que se une específicamente a mesotelina;
 (b) L1 consiste en de 1 a 10 restos de aminoácidos continuos;
 (c) FCS es un sitio de escisión de furina que consiste en restos de aminoácidos continuos capaces de escindirse por furina;
 (d) el dominio III funcional de PE consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 395 a la 613, que opcionalmente comprende

- (i) una sustitución de uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1,
 (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de SEQ ID NO: 1,
 (iii) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 de SEQ ID NO: 1
 (iv) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina o serina en lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y 592 de SEQ ID NO: 1, o
 (v) una combinación de cualquiera de (i)-(iv). Adicionalmente la invención se refiere a una molécula quimérica que se dirige a mesotelina que comprende un polipéptido de fusión que tiene la fórmula M-LI-FCS-FL-dominio III funcional de exotoxina de *Pseudomonas* (PE) caracterizado porque el enlazador flexible (FL) consiste en de 3 a 8 restos de aminoácidos continuos seleccionados independientemente de glicina y serina, en el que

- (a) M es un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento del mismo que se une específicamente a mesotelina;
 (b) L1 consiste en de 1 a 10 restos de aminoácidos continuos;
 (c) FCS es un sitio de escisión de furina que consiste en restos de aminoácidos continuos capaces de escindirse por furina;
 (d) el dominio III funcional de PE consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 395 a la 613, que opcionalmente comprende

- (i) una sustitución de uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1,
 (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de SEQ ID NO: 1,
 (iii) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 de SEQ ID NO: 1
 (iv) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina o serina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y 592 de SEQ ID NO: 1, o
 (v) una combinación de cualquiera de (i)-(iv). Adicionalmente la presente invención se refiere a un polipéptido de fusión que tiene la fórmula FCS-FL-dominio III funcional de exotoxina de *Pseudomonas* (PE) caracterizado porque el enlazador flexible (FL) consiste en de 3 a 8 restos de aminoácidos continuos seleccionados independientemente de glicina y serina, en el que:

- (a) FCS consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 274 a la 284 o en la secuencia de aminoácidos RHRSKRGWEQL (SEQ ID NO: 29);
 (b) El dominio III funcional de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) consiste en los restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 395 a la 613, que opcionalmente comprende

- (i) una sustitución de uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1,
 (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de SEQ ID NO: 1,
 (iii) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 de SEQ ID NO: 1
 (iv) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina o serina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y 592 de SEQ ID NO: 1, o
 (v) una combinación de cualquiera de (i)-(iv). Adicionalmente la invención se refiere a un polipéptido de fusión que tiene la fórmula FCS-FL-dominio III funcional de PE, caracterizado

porque el enlazador flexible (FL) consta de 3 a 8 restos de aminoácidos continuos seleccionados independientemente de glicina y serina, en el que:

(a) FCS consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 274 a la 284 o en la secuencia de aminoácidos RHRSKRGWEQL (SEQ ID NO: 29);

(b) El dominio III funcional de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 395 a la 613, que opcionalmente comprende

(i) una sustitución de uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1,

(ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de SEQ ID NO: 1,

(iii) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 de SEQ ID NO: 1,

(iv) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 de SEQ ID NO: 1, o

(v) una combinación de cualquiera de (i)-(iv). Estructuralmente, la PE mejorada de la divulgación tiene el dominio I de PE eliminado, la mayor parte del dominio II de PE eliminado y un dominio III funcional de PE, opcionalmente, con sustituciones a) del dominio III de PE de las posiciones de restos de aminoácidos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y/o Q592 con una glicina, alanina o serina y/o b) del dominio III de PE de las posiciones de restos de aminoácidos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y/o L597 por glicina, serina o alanina. La mejora radica en la inserción de un enlazador peptídico flexible ("FL") y corto de 3 a 8 aminoácidos de longitud y consta de los restos de glicina y/o serina en secuencia entre el sitio de escisión de furina y el dominio III funcional de PE de la PE mejorada. Por consiguiente, el enlazador corto consta de restos de glicina y/o serina. El enlazador es un péptido de fórmula: (Xaa1)_n en la que cada Xaa1 se selecciona independientemente de glicina y serina y n varía de 3 a 8. Las moléculas de PE mejoradas de la divulgación conservan una alta actividad citotóxica con la eliminación de epítomos de linfocitos B. Sorprendentemente, la inclusión del enlazador flexible corto mejora la citotoxicidad de la molécula sin alterar sustancialmente la escisión de la molécula por furina. Las moléculas de PE mejoradas se ilustran como ejemplo en las realizaciones particulares de la divulgación a las que se hace referencia en el presente documento como (LR/FL/8X, SEQ ID NO: 4) y LR/FL/8M (SEQ ID NO: 5). Además, hay realizaciones, en las que las moléculas PE tienen una o más mutaciones en su dominio III funcional como se encuentra en las SEQ ID NO: 4 o 5 en comparación con el dominio funcional de la PE de SEQ ID NO: 1. En realizaciones adicionales, se contemplan sustituciones adicionales en uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1 que también tienen una función de retención del retículo endoplásmico de la secuencia natural. En otras realizaciones adicionales, el sitio de escisión de furina del dominio II de PE se modifica o se sustituye por otro sitio de escisión de furina.

En algunas realizaciones adicionales, en consonancia con cualquiera de lo anterior, la PE comprende un dominio III funcional que tiene una o más mutaciones en el dominio funcional de una toxina PE de SEQ ID NO: 2 (posiciones 12 a 230) o se selecciona de la siguiente tabla que elimina uno o más epítomos del dominio III de PE:

Tabla 2

Epítomo eliminado	Mutaciones
2	R467A
4	R432G, D406A
5	R490A
6	E548A, R513A
7	K590S, Q592A
*Se describen epítomos, por ejemplo, en Onda, y col., Proc Natl Acad Sci USA. 2008 105(32): 11311-6 y en el documento WO 2007/016150.	

En un aspecto relacionado, la divulgación describe ITR ("las ITR de la divulgación") que son moléculas quiméricas que comprenden (a) un residuo que se dirige a mesotelina conjugado o fusionado con (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") modificada como se ha indicado anteriormente. En algunas realizaciones, el residuo es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un scFv, un dsFv, un Fab, un anticuerpo de dominio sencillo y un F(ab')₂, o un polipéptido que comprende las CDR del anticuerpo. SS1 y MORab-0.09 son residuos de direccionamiento preferidos. Además, el anticuerpo antimesotelina puede comprender una cadena pesada variable ("V_H") y una cadena ligera variable ("V_L"), teniendo cada una de las cadenas V_H y V_L una primera, una segunda y una tercera región determinante de la complementariedad ("CDR"), en la que la primera CDR ("CDR1"), la segunda CDR ("CDR2") y la tercera CDR ("CDR3"), respectivamente, de dicha cadena pesada tiene la secuencia de restos de aminoácidos mostrada para CDR1 (GYTMN; SEQ ID NO: 51), CDR2 (LITPYNGASSYNQKFRG; SEQ ID NO: 52) y CDR3 (GGYDGRGFDY; SEQ ID NO: 53), y en la que las CDR 1, 2 y 3 respectivamente, de dicha cadena V_L, tienen la secuencia de restos de aminoácidos mostradas para CDR1 (SASSSVSYM; SEQ ID NO: 54), CDR2 (DTSKLA; SEQ ID NO: 55) y CDR3 (QQWSGYPLT; SEQ ID NO: 56). En algunas realizaciones, la CDR3 de la cadena ligera se modifica y tiene la secuencia QQWSKHPLT (SEQ ID NO: 57), QQWSGHPLT (SEQ ID NO: 58), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 59), QQWSQIPLT (SEQ ID NO: 60), QQWGFNPLT (SEQ ID NO: 61), QQWGTNPLT (SEQ ID NO: 62), QQWGSHPPLT (SEQ ID NO: 63), QQWGFPLT (SEQ ID NO: 64), QQWGFPLT (SEQ ID NO: 65), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 66) o QQWSGYPTT (SEQ ID NO: 67). En algunas realizaciones adicionales, el anticuerpo antimesotelina es un scFv, dsFv, un Fab o un F(ab')₂. En algunas otras realizaciones adicionales, el anticuerpo antimesotelina para utilizar en la ITR comprende una sustitución de aminoácido de al menos un aminoácido en una CDR seleccionada del grupo que consiste en V_L CDR1, V_L CDR2, V_H CDR1 y V_H CDR2, estando dicho aminoácido codificado por un codón que comprende un nucleótido que pertenece a un motivo de punto caliente seleccionado de AGY o RGYW, en el que R es A o G, Y es C o T y W es A o T.

En un aspecto adicional, la divulgación describe composiciones farmacéuticas que comprenden

(a) una ITR de la divulgación como se ha descrito anteriormente y (b) un transportador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto relacionado, la divulgación describe ácidos nucleicos aislados que codifican un FL de una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") o una ITR descrita anteriormente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica adicionalmente todo o un fragmento (una cadena ligera o pesada variable o CDR) del anticuerpo que se dirige a mesotelina.

Por consiguiente, en un primer grupo de realizaciones, la divulgación describe exotoxinas A de *Pseudomonas* ("PE") modificadas, que comprenden una secuencia polipeptídica continua de la siguiente fórmula: FCS-FL-dominio III funcional de PE o LI-FCS-FL-dominio III funcional de PE, en la que L1 consta de una secuencia peptídica continua de 1 a 10 restos de aminoácidos de longitud; FCS representa el sitio o la secuencia de escisión de furina (por ejemplo RHRQPRGWEQL; SEQ ID NO: 17) u otra secuencia que pueda escindirse con furina; y FL representa una secuencia peptídica de enlazador flexible que consta de 3 a 8 restos de aminoácidos seleccionados independientemente de glicina y serina; y el dominio III funcional de PE comprende los restos 395-613 de SEQ ID NO: 1, que opcionalmente comprende (i) sustituciones en uno o más restos que corresponden a 609-613 de SEQ ID NO: 1, (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición que corresponde a la posición 490 de SEQ ID NO: 1, (iii) una sustitución de uno o más restos que corresponden a los restos de SEQ ID NO: 1, cuyos restos de SEQ ID NO: 1 conservan la inmunogenicidad de un epitopo o subepitopo del dominio III de PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i)-(iii). En realizaciones preferidas, el dominio funcional de PE es el dominio funcional de PE de LR/FL/8X (SEQ ID NO: 4) o de LR/GGS/8M (SEQ ID NO: 3).

En un grupo adicional de realizaciones, la divulgación proporciona moléculas quiméricas o IRT que comprenden (a) un ligando o residuo de direccionamiento, cuyo ligando se une específicamente a mesotelina en una superficie celular, conjugado o fusionado con (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) modificada como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el ligando es un anticuerpo o un fragmento del mismo que conserva la capacidad de reconocimiento por el antígeno. En realizaciones preferidas, los anticuerpos proceden de un anticuerpo parental SS1. Preferentemente, la ITR es SS1-LR/GGS/8X que tiene un FL GGS insertado entre el sitio de escisión de furina, FCS y el dominio III funcional. Por consiguiente, estas ITR pueden comprender una cadena ligera variable de SS1 de SEQ ID NO: 6 y una secuencia de inmunotoxina recombinante de cadena pesada variable de SS1 de SEQ ID NO: 8 o de SEQ ID NO: 9 en la que las cadenas ligera y pesada variables de SS1 forman un anticuerpo estabilizado con disulfuro.

En otro grupo adicional de realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos terapéuticos de destrucción de células diana o de inhibición del crecimiento de células diana que expresan o sobreexpresan mesotelina en el exterior de la célula. Los procedimientos comprenden poner en contacto las células con las ITR de la invención. La mesotelina es un antígeno de diferenciación presente en la superficie de cánceres de ovario, mesoteliomas y diversos otros tipos de cánceres humanos. Las ITR de la divulgación pueden utilizarse, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo* para destruir o inhibir el crecimiento de cánceres de ovario, estómago, células escamosas, mesoteliomas y otras células malignas que expresan mesotelina. Las ITR de la invención se contemplan para su uso en un procedimiento de tratamiento de pacientes que tienen estas afecciones y que necesitan dicho tratamiento.

En otro grupo adicional de realizaciones, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican las PE mutadas y las ITR descritas anteriormente.

En algunas realizaciones de cualquiera de lo anterior el enlazador flexible es GGS o GGSGGS (SEQ ID NO: 18).

5 En otras realizaciones adicionales más, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un scFv, un dsFv, un Fab, un anticuerpo de dominio sencillo y un F(ab')₂. En algunas realizaciones adicionales de lo anterior, el anticuerpo es SS1 o un SS1 modificado por ingeniería genética (un scFv, un dsFv, un Fab, un anticuerpo de dominio sencillo, o un F(ab')₂ del anticuerpo SS1, o uno o más fragmentos que proporcionan las porciones CDR del anticuerpo SS1). En algunas realizaciones, las CDR del anticuerpo se utilizan como residuo de direccionamiento. En algunas realizaciones, el anticuerpo es humano o está humanizado. En algunas realizaciones, la PE modificada es
10 LR/GGS/8M (SEQ ID NO: 3) o LR/(Xaa1)_n/8X (SEQ ID NO: 4) o LR/(Xaa1)_n/8M (SEQ ID NO: 5). En algunas realizaciones adicionales, la molécula quimérica es SS1-LR/GGS/8X (SEQ ID NOS: 6 y 7) o SS1-LR/GGS/8M (SEQ ID NO: 6 y 8) en la que sus residuos de direccionamiento respectivos comprenden las porciones V_L y V_H del anticuerpo SS1.

Otras realizaciones serán obvias para los expertos habituales y se describen en el presente documento.

15 Por consiguiente, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona una molécula quimérica que comprende un fragmento de anticuerpo antimesotelina directamente unido en secuencia a un primer enlazador peptídico de 3 a 8 aminoácidos de longitud que se une directamente en secuencia al sitio de escisión del polipéptido furina RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 17) que se une directamente en secuencia a un segundo enlazador peptídico que consta de 3 a 6 aminoácidos seleccionados de Gly y Ser y que se une directamente en secuencia al aminoácido N
20 terminal de un dominio III funcional de la exotoxina A de *Pseudomonas*. En algunas realizaciones adicionales, el dominio funcional es el dominio III de LR o LR/8M y el fragmento de un anticuerpo es el dsFv de SS1-LR. En algunas realizaciones, en las que el primer enlazador (L1) peptídico está directamente unido en secuencia al extremo carboxilo de la porción VH del dsFv. También se proporcionan composiciones farmacéuticas de las moléculas quiméricas así como dichas composiciones para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer que sobreexpresa mesotelina en un sujeto que lo necesita. En realizaciones adicionales, el cáncer es un
25 adenocarcinoma de pulmón, un carcinoma de ovario, un mesotelioma o un carcinoma epidermoide.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1. Inmunotoxinas recombinantes. (A) La inmunotoxina recombinante SS1P consta de cadenas polipeptídicas pesada (VH) y ligera (VL) estabilizadas con disulfuro (ds) del fragmento variable (Fv) del anticuerpo monoclonal antimesotelina SS1 acoplado a un fragmento de 38 kDa de exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38) mediante un enlazador peptídico corto (ASGG; SEQ ID NO: 19) de la cadena pesada. PE38 está compuesto por el dominio II, el dominio III y un fragmento de dominio Ib de la exotoxina A de *Pseudomonas* natural. El dominio II incluye un bucle expuesto a disolvente, unido por cisteínas que forman un enlace disulfuro, que contiene un sitio de escisión de furina proteasa (RHRQPRGWEQL; SEQ ID NO: 17). (B) La variante resistente a degradación lisosómica de SS1P, SS1-LR, carece del dominio Ib y del dominio II de PE, excepto por un tramo de 11 restos que contiene el sitio de escisión de furina del dominio II. Se crearon diversas construcciones con mutaciones (subrayadas) alrededor del sitio de escisión de furina de SS1-LR (SEQ ID NOS: 20-24).

40 Figura 2. Citotoxicidad de SS1-LR en líneas celulares positivas a mesotelina. Se incubaron las líneas celulares L55, NCI-H322M, HAY, KB31, M30, A431/K5, OVCAR-8 y A1847 con concentraciones crecientes de SS1P (círculos blancos, línea continua) o de SS1-LR (cuadrados blancos, línea discontinua). Después de 3 días se evaluó la viabilidad celular con un ensayo colorimétrico WST-8, y se normalizó entre controles tratados y no tratados con ciclohexamida. Se representan gráficamente los valores medios y los errores típicos de seis repeticiones. SS1-LR comprende la cadena polipeptídica V_L de SS1 estabilizada con disulfuro de SEQ ID NO: 6 y la cadena polipeptídica de VH-PE SS1 de SEQ ID NO: 74.

45 Figura 3. Altas dosis de SS1-LR tienen fuerte actividad antitumoral. Ratones lampiños (*nude*) con tumores de xenoinjerto A431/K5 se trataron por vía intravenosa los días 5, 7 y 9 después de la implantación con tampón RIT (HSA al 0,2 % en PBS; cruces, línea continua), 0,3 mg/kg de SS1P (círculos blancos, línea continua) o de SS1-LR a dosis de 6 (cuadrados blancos, línea continua) o 15 (cuadrados negros, línea discontinua) mg/kg. Las flechas indican días en los que se administró el tratamiento. El tamaño del tumor se midió durante un ciclo de 22 días. Los puntos representan el tamaño medio del tumor de todos los ratones en el grupo de tratamiento (n = 6). Las barras de error indican el error típico de cada valor medio.

50 Figura 4. Procesamiento de inmunotoxina internalizada. Células A431/K5 se incubaron ininterrumpidamente con (A) SS1P o (B) SS1-LR, se produjo la lisis a diversos momentos de 0 a 24 horas y se analizaron mediante transferencia de Western SDS-PAGE no reductora con un anticuerpo anti-PE. Se indican bandas de longitud completa, reducida y escindidas con furina. (C) La intensidad de la banda escindida con furina relativa a la intensidad total de todas las bandas A cada momento se muestra para SS1P (círculos blancos, línea continua) y SS 1-LR (cuadrados blancos, línea discontinua).

Figura 5. La adición de un enlazador flexible potencia la citotoxicidad de SS1-LR. Las líneas celulares (A) KB31 y (8) NCI-H322M se incubaron con concentraciones crecientes de SS1P (círculos blancos, línea continua), SS1-LR (cuadrados blancos, línea discontinua), SS1-LR/GGS (rombos blancos, línea continua) o SS1-LR/GGS R279G (hexágonos rellenos, sin línea). Después de 3 días, se evaluó la viabilidad celular con un ensayo colorimétrico WST-8, y se normalizó entre los controles tratados y no tratados con ciclohexamida. Se representan gráficamente los valores medios y los errores típicos de seis repeticiones.

Figura 6. Citotoxicidad de SS1-LR/GGS/8M en células de pacientes. Células cultivadas de líquido pleural o ascitis de pacientes con mesotelioma se sembraron en placa con concentraciones crecientes de las ITR SS1P (barra blanca) o SS1-LR/GGS/8M (barra gris). Después de 4 días, las células se fijaron y tiñeron con violeta de cristal para detectar las células intactas. La absorbancia resultante a 595 nm se normalizó frente a un control no tratado. Se representan gráficamente los valores medios y los errores típicos de tres repeticiones. Sin asterisco = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Figura 7. Comportamiento *in vivo* de SS1-LR/GGS/8M. A) Actividad antitumoral de SS1-LR/GGS/8M. Ratones lampiños con tumores de xenoinjerto L55 se trataron por vía intravenosa los días 7, 9 y 12 después de la implantación con tampón RIT (HSA al 0,2 % en D-PBS; cruces, línea continua), 0,4 mg/kg de SS1P (círculos blancos, línea continua) o SS1-LR/GGS/8M a dosis de 0,4 (cuadrados blancos, línea discontinua) o 2,5 (cuadrados negros, línea discontinua) mg/kg. Las flechas indican días en los que se administró el tratamiento. El tamaño del tumor se midió durante un ciclo de 30 días. Los puntos representan el tamaño medio del tumor de todos los ratones en el grupo de tratamiento ($n = 7$). Las barras de error indican el error típico de cada valor medio. B) Modelo de rata de síndrome de filtración capilar. Las ratas se trataron por vía intravenosa con PBS, SS1P o SS1-LR/GGS/8M, se observaron después de 24 horas y posteriormente se sacrificaron. El líquido torácico de los animales a los que se realizó la eutanasia se recogió y se midió. Los pulmones de diversas ratas se fijaron, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. C) Se muestran gráficos representativos a 200X de aumento. D) Parámetros farmacocinéticos de SS1-LR/GGS/8M. A ratones BalbC se les inyectó por vía intravenosa 10 μ g de SS1P o SS1-LR/GGS/8M y se extrajo la sangre a diversos intervalos entre 2 y 60 minutos desde el tiempo de inyección. La concentración de inmunotoxina en el suero a los diversos intervalos se determinó por ELISA y se ajustó a una sola función de degradación exponencial. Se indica la semivida ($t_{1/2}$) correspondiente. Cada punto es la concentración de inmunotoxina en el suero de un ratón, y se determinó concentración a cada intervalo de tiempo de al menos dos ratones diferentes.

Figura 8. Antigenicidad humana de SS1-LR/GGS/8M. La reactividad de SS1P y SS1-LR/GGS/8M con anticuerpos preexistentes en sueros humanos se comparó utilizando un ensayo de desplazamiento para determinar la concentración a la cual las dos ITR reducían la señal de un ELISA para detectar anticuerpos en suero al 50 % (CI₅₀). En esta figura, los valores de CI₅₀ relativos de SS1P con respecto a SS1-LR/GGS/8M se representan gráficamente. La antigenicidad de SS1-LR/GGS/8M se reduce drásticamente con respecto a SS1P en todos los sueros.

Figura 9. Resumen de citotoxicidad de SS1-LR/GGS/8M en células de pacientes. Viabilidad relativa frente a tratamiento. Células cultivadas de líquido pleural o ascitis de pacientes con mesotelioma se sembraron en placas con concentraciones crecientes de SS1P (barra blanca) o de SS 1-LR/GGS/8M (barra gris). Después de 4 días, las células se fijaron y se tiñeron con violeta de cristal para detectar las células intactas. La absorbancia resultante a 595 nm se normalizó frente a un control no tratado. Se representan gráficamente los valores medios y los errores típicos de tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas de $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***).

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona una variante menos tóxica y menos inmunogénica de las ITR antimesotelina basada en la ITR SS1P antimesotelina basada en PE. Nuestra evaluación inicial de SS1-LR, generada basándose en un trabajo previo con la ITR HA22-LR anti-CD22 basada en PE (Weldon y col., Blood 113 (6): 3792-3800 (2009)), mostró actividad muy variable en una selección de líneas celulares que expresaban mesotelina *in vitro*. En un ensayo de tumor de xenoinjerto de ratón A431/K5, la SS1-LR (SEQ ID NO: 6 y 7) era menos activa que la SS1P, pero la SS1-LR podría administrarse a dosis mucho más altas para lograr una regresión tumoral significativa. Mientras se exploraban las razones de su actividad altamente variable en relación con SS1P, se estudió la internalización y el procesamiento de SS1-LR y se encontró que la proporción de SS1-LR escindida por furina fue mucho menor que la de SS1P. Esto sugirió que la disminución de la escisión de furina podría limitar la actividad de SS1-LR, y hemos diseñado y producido varios mutantes para probar esta hipótesis. La adición de un enlazador corto de Gly-Gly-Ser después del sitio de escisión de furina potenció la actividad de SS1-LR en líneas celulares, pero sorprendentemente la citotoxicidad potenciada no correspondía a una escisión de furina potenciada. La presente divulgación se refiere a este descubrimiento sorprendente de la importancia de un enlazador corto, flexible para la citotoxicidad de una construcción de ITR antimesotelina independiente de cualquier efecto sobre la escisión de PE por furina. En otros trabajos, se incorporaron 8 mutaciones puntuales que se ha demostrado que reducen la inmunogenicidad de PE en SS1-LR/GGS y después se ensayó la molécula en células malignas primarias de pacientes con mesotelioma. La molécula final, SS1-LR / GGS / 8M (SEQ ID NO: 6 y 8) demostró una citotoxicidad similar a SS1P. Además, la ITR de acuerdo con la divulgación puede proporcionar una toxicidad inespecífica

notablemente reducida (por ejemplo, síndrome de filtración capilar) en mamíferos.

Se observó una diferencia de aproximadamente 20 veces en el efecto antitumoral entre SS1-LR y SS1P utilizando un modelo de ratón de tumor de xenoinjerto A431K5 *in vivo*. Esta diferencia no puede atribuirse totalmente a la citotoxicidad, ya que los datos de citotoxicidad *in vitro* indican una disminución de 4 veces en la citotoxicidad en células A431/K5. En su lugar, el resto de esta diferencia se debe probablemente a las propiedades farmacocinéticas de SS1-LR en ratones. Hemos demostrado previamente que HA22-LR tiene una semivida en suero 2 veces más corta en ratones que HA22 (7,8 frente a 14,6 minutos, respectivamente), y se postuló que la diferencia se debió a un aumento de la filtración renal de la molécula LR más pequeña (Weldon JE, Blood., 113(16): 3792-800 (2009)). Examinando el área bajo la curva de degradación, esta diferencia en la semivida sugiere una diferencia de 4 veces en la proteína disponible en el transcurso de una hora. Por lo tanto, la diferencia de actividad *in vivo* puede atribuirse tanto a la disminución de la citotoxicidad como a una semivida más corta.

Aunque la SS1-LR demostró una menor actividad antitumoral que la SS1P *in vivo*, su toxicidad inespecífica también se redujo enormemente en los ratones. Aprovechamos esta propiedad para aumentar drásticamente la dosis de SS1-LR sobre SS1P (50 veces) en el ensayo de tumor de xenoinjerto, lo que conduce a un efecto antitumoral enormemente potenciado. Los experimentos anteriores han mostrado varias veces que la DL50 intravenosa de una sola dosis de SS1P es de 1,0 mg/kg en ratones Balb/C (Filpula D y col., Bioconjug Chem., 18 (3): 773-84 (2007)) y de 0,75 mg/kg en ratones Swiss NIH (Onda M y col., Cancer Res., 61(13): 5070-7 (2001)). Utilizando un programa de dosificación C2Dx3 similar al programa clínico, los ratones han tolerado una dosis máxima de 0,3 mg/kg de SS1P (observaciones no publicadas). Sin embargo, la SS1-LR, se administró D2Dx3 en el experimento antitumoral de xenoinjerto A431/K5 a una dosis de 15 mg/kg sin efecto adverso. Anteriormente, una sola dosis intravenosa de HA22-LR a 20 mg/kg no mostró toxicidad para los ratones (Weldon JE, Blood., 113 (16): 3792-800 (2009)), y hemos administrado dosis únicas de HA22-LR hasta de 45 mg/kg a los ratones sin causar la muerte (observaciones no publicadas). Aunque ninguna molécula LR ha sido probada clínicamente, este efecto sugiere que las ITR variantes LR pueden tener una toxicidad disminuida en pacientes humanos, lo que podría prevenir toxicidades limitantes de dosis y permitir administrar dosis más altas.

Aunque la SS1-LR fue eficaz *in vitro* e *in vivo*, nos preocupó la disminución general de la actividad relativa a la SS1P. Una posible explicación de esta disparidad es una diferencia en la ruta de intoxicación intracelular. La variante LR de PE38 contiene delecciones extensas en el dominio II y Ib de PE, y estas delecciones podrían haber afectado negativamente a la capacidad de tránsito de la PE al citosol. Curiosamente, nuestros experimentos iniciales para detectar la PE de longitud completa y procesada en lisados de células tratadas con SS1P y SS1-LR mostraron una diferencia drástica en la cantidad de ITR procesada por furina. Se procesó una gran fracción de la ITR total en células tratadas con SS1P, pero solo una pequeña fracción de la ITR total en células tratadas con SS1-LR. Este resultado sugiere que la escasa escisión de furina podría limitar la actividad de SS1-LR, y se propuso mejorar esta etapa de la ruta de intoxicación de PE.

Los esfuerzos para aumentar la citotoxicidad de SS1-LR aumentando la accesibilidad del sitio de escisión de furina produjeron una ITR más activa, pero no pudimos demostrar escisión de furina potenciada. La adición de un enlazador Gly-Gly-Ser corto (SS1-LR/GGS, Fig. 1B), de un enlazador más largo (SS1-LR/GGSx2, Fig. 1B) o de una repetición del sitio de furina flanqueado por enlazadores Gly-Gly-Ser cortos (SS1-LR/2xFurina, Fig. 1B) todos concedieron un aumento moderado de citotoxicidad. Sin embargo, ninguna de estas moléculas potenció la proporción de SS1-LR escindida con furina en células A431/K5 tratadas o aumentó la velocidad de escisión de furina *in vitro*. Se llegó a la conclusión de que la adición de un enlazador debe aumentar la citotoxicidad a través de otro mecanismo, tal vez relacionado con el tránsito intracelular de la molécula en las células ensayadas.

Estos experimentos también demostraron la absoluta necesidad de escisión de furina para conservar la citotoxicidad de SS1P. Una mutación puntual en SS1-LR / GGS que cambió una arginina esencial para la escisión a glicina (SS1-LR/GGS R279G, Fig. 1B) produjo una proteína que no fue escindida por furina. Esta ITR no mostró actividad en ninguna de las células NCI-H322M ni KB31. La necesidad de escisión de furina en la ruta de intoxicación por PE ha sido cuestionada recientemente (Morlon-Guyot J y col., Infect Immun., 77 (7): 3090-9 (2009)), pero existen muchas pruebas de que la furina desempeña un papel crucial durante la intoxicación (Ornatowski W y col., J Clin Invest, 117 (11): 3489-97 (2007); Shiryayev SA y col., J Biol Chem, 282 (29): 20847-53 (2007); Sarac MS y col., Infect Immun, 70 (12): 7136-9 (2002); Chiron MF, Fryling CM y FitzGerald D, J Biol Chem, 272 (50): 31707-11 (1997); Gu M y col., Infect Immun., 64 (2): 524-7 (1996), Inocencio NM, Moehring JM y Moehring TJ, J Biol Chem., 269 (50): 31831-5 (1994); Moehring JM y col., J Biol Chem., 268 (4): 2590-4 (1993)). En el caso aquí presentado, la intoxicación por PE fracasa sin contener un sitio adecuado para el procesamiento de furina. La investigación está en curso para explorar la relación entre la escisión de furina y la citotoxicidad.

Una línea de investigación distinta en nuestro laboratorio ha producido recientemente una variante de HA22, HA22-LR-8M, que tiene inmunogenicidad extremadamente baja debido a la eliminación de epítopos de linfocitos B (Onda M y col., Presentado para publicación en PNAS). HA22-LR-8M contiene las mismas delecciones que la variante LR de PE, pero también incorpora ocho mutaciones puntuales en el dominio de PE. Estas mutaciones se colocaron en SS1P para generar SS1-LR/GGS/8M. Las únicas diferencias entre HA22-LR-8M y SS1-LR/GGS/8M son el anticuerpo Fv y el enlazador GGS después del sitio de escisión de la furina. Dado que la inmensa mayoría de la respuesta inmunitaria contra las ITR está dirigida a PE, SS1-LR/GGS/8M debe exhibir Inmunogenicidad

similarmente reducida.

La citotoxicidad de SS1-LR/GGS/8M se comparó con la de SS1P en células malignas primarias de pacientes con mesotelioma, y los resultados mostraron que SS1-LR/GGS/8M tenía citotoxicidad comparable a, o mejor que, la de SS1P. Además de una buena actividad, SS1-LR/GGS/8M tiene posibles ventajas sobre SS1P que incluyen

5 disminución de la toxicidad inespecífica y baja inmunogenicidad. Los experimentos descritos en el presente documento sugieren que SS1-LR/GGS/8M sería un excelente candidato para la clínica debido a su baja inmunogenicidad, baja toxicidad inespecífica y buena citotoxicidad.

Definiciones

10 Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada por el Sistema de Unidades Internacional (SI) Los intervalos numéricos se incluyen en los números que definen el intervalo. A menos que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxilo. Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la divulgación, que pueden hacerse por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos

15 inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") natural es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas. La secuencia de PE natural se expone en la SEQ ID NO: 1 de la patente de Estados Unidos n.º 5.602.095. El procedimiento de acción es la inactivación del factor 2 de elongación (EF- 2) por ADP ribosilación. La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan al unisono causando citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) actúa como mediador en la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación en el citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) actúa como mediador en la ADP ribosilación del factor 2 de elongación. La estructura original de PE clasifica el dominio III como los restos 405-613, no 400-613.

25 Allured VS, Collier RJ, Carroll SF & McKay DB, Proc Natl Acad Sci USA 83, 1320-1324 (1986). La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) sigue siendo indefinida, aunque una gran parte del mismo, aminoácidos 365-380, puede deleccionarse sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall, y col., J Biol Chem 264: 14256-61 (1989). En la técnica se conocen numerosas modificaciones de este tipo e incluyen, pero sin limitación, la eliminación del dominio Ia, diversas deleciones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de aminoácidos sencillos y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo, tales como KDEL (SEQ ID NO: 16) y REDL (SEQ ID NO: 26). Véase Siegall, y col., J. Biol. Chem. 264: 14256-14261 (1989). Las inmunotoxinas de la presente divulgación tienen la capacidad de efectuar la translocación y ribosilación del factor 2 de elongación, EF-2, en una célula diana.

En el presente documento, las mutaciones de PE se describen por referencia al resto de aminoácido presente en una posición particular de la secuencia de PE natural (SEQ ID NO: 1) de 613 aminoácidos, seguido del aminoácido por el cual se ha reemplazado ese resto en la mutación particular en cuestión. Por tanto, por ejemplo, el término "R490A" indica que la "R" (arginina, según el código convencional de una sola letra) en la posición 490 de la molécula a la que se hace referencia, se reemplaza por una "A" (alanina, según el código convencional de una sola letra), mientras que "K590Q" indica que la lisina, normalmente presente en la posición 590, se ha reemplazado por una glutamina. El código convencional de una sola letra para los aminoácidos habituales se expone más adelante.

40 Las expresiones "dominio III funcional de PE" o "Dominio III de PE funcional" se refieren a los restos 395-613 de la PE natural (la secuencia natural es SEQ ID NO: 1). Aunque los límites estructurales del dominio III se han establecido en los restos 405-613, análisis funcionales han mostrado que el dominio III requiere un segmento del dominio Ib para conservar la actividad de ADP ribosilación (Hwang, J. y col., Cell, 48: 129-136 (1987); Siegall, C. B. y col., J Biol Chem, 264: 14256-14261 (1989)). El dominio III funcional de PE se define por tanto por los restos 395-613 de PE (Kihara, A. y Pastan, I., Bioconj Chem, 5: 532-538 (1994)). En el presente documento, la secuencia del dominio III funcional de PE incluye las modificaciones opcionales para reducir la antigenicidad y secuencias de retención del retículo endoplasmático alternativas opcionales.

Los restos terminales del dominio III de PE, REDLK (SEQ ID NO: 15) pueden modificarse de modo que aumente la citotoxicidad de las ITR resultantes de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, las inmunotoxinas creadas con las PE mutadas que acaban en las secuencias KDEL (SEQ ID NO: 16), REEL (SEQ ID NO: 27) o RDEL (SEQ ID NO: 28) pueden ser mucho más citotóxicas contra células diana que las inmunotoxinas creadas con PE38 que lleva la secuencia terminal natural. Véase, Kreitman y Pastan, Biochem J, 307 (Pt 1): 29-37 (1995). Las repeticiones de estas secuencias también pueden utilizarse en las ITR presentes. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.854.044; 5.821.238 y 5.602.095 y la publicación internacional WO 99/51643. Aunque las PE que terminan en KDEL (SEQ ID NO: 16) son útiles para fines *in vitro*, estas pueden tener más toxicidad inespecífica en animales y ser menos preferidas para uso *in vivo*.

El término "mesotelina" se refiere a una proteína y a fragmentos de la misma, presentes en la superficie de algunas células humanas y unidas, por ejemplo, mediante el anticuerpo K1. Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la mesotelina se exponen, por ejemplo, en la solicitud PCT publicada WO 97/25.068 y en las

patentes de Estados Unidos n.º 6.083.502 y 6.153.430. Véase también, Chang, K. y Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57: 90 (1994); Chang, K. y Pastan, I., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 136 (1996); Brinkmann U., y col., *Int. J. Cancer* 71: 638 (1997); Chowdhury, P.S., y col., *Mol. Immunol.* 34: 9 (1997) y la patente de Estados Unidos n.º 6.809.184. La mesotelina se expresa como una proteína precursora de aproximadamente 69 kDa, que después se procesa para liberar una proteína de 30 kDa, mientras que queda unida a la superficie celular la glucoproteína de superficie celular unida a glucosilfosfatidilinositol de 40 kDa descrita en los *Antecedentes*. En el presente documento, el término “mesotelina” se refiere a la glucoproteína de 40 kDa. Se han registrado las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la mesotelina de diferentes especies, por ejemplo, de ser humano (NM_005823.4→NP_005814.2; y NM_013404.3→NP_037536.2), de ratón (NM_018857.1→NP_061345.1), de rata (NM_031658.1→NP_113846.1), de bovino (NM_001100374.1→NP_001093844).

Por conveniencia de referencia, como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos completos (algunas veces denominados “intactos” en el presente documento), fragmentos de anticuerpos que conservan el reconocimiento antigénico y la capacidad de unión, producidos tanto por la modificación de anticuerpos completos como sintetizados de nuevo utilizando metodologías de ADN recombinante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y miméticos de anticuerpos, salvo que por contexto se requiera de otra manera. El anticuerpo puede ser una IgM, IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄), IgD, IgA o IgE.

Las secuencias de las regiones constantes de las subclases de IgG se conocen bien en la técnica desde hace tiempo (por ejemplo, Honjo y col., *Cell*, 18: 559-68 (1979); Tucker y col., *Science*, 206: 1303-6 (1979); Yamawaki y col., *Nature* 283: 786-9 (1980); Ellison y col., *Nucl Acids Res* 10: 4071-9 (1982); Ellison y col., *DNA* 1: 11-8 (1981); Ellison y Hood, *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 1984-8 (1982)). Dado que las CDR de las regiones variables determinan la especificidad del anticuerpo, las CDR o los fragmentos Fv de los anticuerpos contra un antígeno de superficie celular diana pueden injertarse o modificarse por ingeniería genética en un anticuerpo de elección para conferir especificidad para el antígeno de superficie celular diana sobre ese anticuerpo. Por ejemplo, las CDR de un anticuerpo contra un antígeno de superficie celular diana puede injertarse sobre un armazón (*framework*) de anticuerpo humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/45322; WO 87/02671; las patentes de Estados Unidos n.º 5.859.205; 5.585.089 y 4.816.567; la solicitud de patente EP 0173494; Jones, y col. *Nature* 321: 522 (1986); Verhoeyen, y col., *Science* 239: 1534 (1988), Riechmann, y col. *Nature* 332: 323 (1988) y Winter y Milstein, *Nature* 349: 293 (1991)) para formar un anticuerpo que suscitará una respuesta escasa o no inmunogénica cuando se administra a un ser humano. Como alternativa, las regiones constantes de los anticuerpos pueden modificarse por ingeniería genética reemplazando restos encontrados en animales no humanos, tales como ratones, con restos normalmente encontrados en seres humanos. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética de este modo se denominan “anticuerpos humanizados” y son preferidos, dado que tienen un menor riesgo de inducir efectos secundarios y pueden permanecer en la circulación más tiempo. En la técnica se conocen procedimientos de humanización de anticuerpos y se exponen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 6.180.377; 6.407.213; 5.693.762; 5.585.089 y 5.530.101.

La expresión “fragmentos de anticuerpo” significa moléculas que comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la unión antigénica o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; anticuerpos de dominio sencillo (véanse, por ejemplo, Wesolowski, *Med Microbiol Immunol.* (2009) 198(3): 157-74; Saerens, y col., *Curr Opin Pharmacol.* (2008) 8(5): 600-8; Harmsen y de Haard, *Appl Microbiol Biotechnol.* (2007) 77(1): 13-22); anticuerpos estabilizados con hélice (véase, por ejemplo, Arndt y col., *J Mol Biol* 312: 221-228 (2001)); diacuerpos (véase más adelante); moléculas de anticuerpo monocatenario (“scFvs,” véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.888.773); anticuerpos estabilizados con disulfuro (“dsFvs” véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.747.654 y 6.558.672) y anticuerpos de dominio (“dAbs,” véase, por ejemplo, Holt y col., *Trends Biotech* 21(11): 484-490 (2003), Ghahroudi y col., *FEBS Lett.* 414: 521-526 (1997), Lauwereys y col., *EMBO J* 17: 3512-3520 (1998), Reiter y col., *J. Mol. Biol.* 290: 685-698 (1999), Davies y Riechmann, *Biotechnology*, 13: 475-479 (2001)).

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión antigénica, cuyos fragmentos comprenden un dominio pesado (*Heavy*) variable (“V_H” o “VH”) conectado a un dominio ligero (*Light*) variable (“V_L” o “VL”) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Utilizando un enlazador que sea muy corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión antigénica. Los diacuerpos y su posición se describen más detalladamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y en Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

La expresión “anticuerpo parental” significa cualquier anticuerpo de interés en el que se ha efectuado una mutación o modificación para obtener anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unan al mismo epítipo que el anticuerpo parental, pero con mayor afinidad.

Un “residuo de direccionamiento” es la porción de un inmunoconjugado destinada a dirigir el inmunoconjugado a una célula de interés. Normalmente, el residuo de direccionamiento es un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo que conserva la capacidad de reconocimiento por el antígeno, tal como un scFv, un dsFv, un Fab o un F(ab')₂

Un “residuo tóxico” es la porción de una inmunotoxina que hace que la inmunotoxina sea citotóxica a células de

interés. Con respecto a las inmunotoxinas, que son el objeto de la presente divulgación, el residuo tóxico es una exotoxina A de *Pseudomonas* que se ha modificado/mutado para reducir su citotoxicidad inespecífica, como se describe más adelante con mayor detalle.

5 Normalmente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y otra ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones también se conocen como “dominios”). Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región “marco conservada” ininterrumpida por tres regiones hipervariables, denominadas también “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”. Se ha definido la extensión de la región marco conservada y de las CDR. Las secuencias de las regiones marco conservadas de diferentes cadenas ligera o pesada están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco conservada de un anticuerpo, es decir las regiones marco conservadas combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

10 Las CDR son principalmente responsables de la unión de un antígeno a un epítipo. Las CDR de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N, y también se identifican normalmente por la cadena en la que se localiza la CDR particular. Por tanto, una CDR3 V_H se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

15 Las referencias a “V_H” o a “VH” se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a “V_L” o a “VL” se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

20 Las frases “Fv monocatenario” o “scFv, de inglés *single chain*” se refieren a un anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo de dos cadenas tradicional, se han unido para formar una cadena. Normalmente, para permitir el plegamiento adecuado y la creación de un sitio de unión activo, entre las dos cadenas se inserta un péptido enlazador.

25 Las frases “enlace disulfuro” o “enlace disulfuro cisteína-cisteína” se refiere a una interacción covalente entre dos cisteínas en las que los átomos de azufre de las cisteínas se oxidan para formar un enlace disulfuro. La energía promedio de enlace de un enlace disulfuro es de aproximadamente 60 kcal/mol en comparación con 1-2 kcal/mol de un enlace de hidrógeno.

30 Las frases “Fv estabilizada por disulfuro” o “dsFv” se refieren a la región variable de una inmunoglobulina en la que entre la cadena ligera y la cadena pesada hay un enlace disulfuro. En el contexto de la presente divulgación, las cisteínas que forman el enlace disulfuro están dentro de las regiones marco conservadas de las cadenas del anticuerpo y sirven para estabilizar la conformación del anticuerpo. Normalmente, el anticuerpo se modifica por ingeniería genética para introducir cisteínas en la región marco conservada en las posiciones en las que la sustitución no interferirá con la unión antigénica.

35 La expresión “péptido enlazador” incluye la referencia a un péptido dentro de un fragmento de unión a anticuerpo (por ejemplo, el fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente el dominio variable de la cadena pesada con el dominio variable de la cadena ligera.

40 El término “punto caliente” significa una porción de una secuencia de nucleótidos de una CDR o de una región marco conservada de un dominio variable que es un sitio de variación natural particularmente alta. Aunque se considera que las propias CDR son regiones de hipervariabilidad, se sabe que las mutaciones no están uniformemente distribuidas a lo largo de las CDR. Se han identificado sitios, o puntos calientes, particulares como estas localizaciones que experimentan mutaciones concentradas. Los puntos calientes se caracterizan por diversas características y secuencias estructurales. Estos “motivos de puntos calientes” pueden utilizarse para identificar puntos calientes. Dos motivos de secuencias consenso que están especialmente bien caracterizados son la secuencia tetranucleotídica RGYW y la secuencia de serina AGY, en la que R es A o G, Y es C o T, y W es A o T.

45 Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede generarse por procedimientos recombinantes, tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, véase, por ejemplo, Huse, y col., *Science* 246: 1275-1281 (1989); Ward, y col., *Nature* 341: 544-546 (1989); y Vaughan, y col., *Nature Biotech.* 14: 309-314 (1996) o inmunizando a un animal con el antígeno o con el ADN que codifica el antígeno.

50 La expresión “residuo efector” significa la porción de un inmunoconjugado destinada a tener un efecto en una célula dirigida por el residuo de direccionamiento o para identificar la presencia del inmunoconjugado. En el contexto de la presente divulgación, el residuo efector es una exotoxina A de *Pseudomonas* modificada o mutada.

El término “inmunoconjugado” incluye la referencia a un enlace covalente de una molécula efectora con un anticuerpo.

55 Las expresiones “cantidad eficaz” o “cantidad eficaz para” o “cantidad terapéuticamente eficaz” incluyen referencias a una dosificación de un agente terapéutico suficiente para producir un resultado deseado, tal como inhibir la síntesis

de proteína celular al menos un 50 %, o destruir la célula.

En el contexto de la presente divulgación, la toxina es una exotoxina A de *Pseudomonas* mutada.

La expresión “poner en contacto” incluye la referencia a la colocación en asociación física directa.

5 Un “plásmido de expresión” comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de interés, que está unida operativamente a un promotor.

10 Como se utiliza en el presente documento, “polipéptido”, “péptido” y “proteína”, se utilizan indistintamente e incluyen referencia a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los términos también se aplican a polímeros que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas de tal manera que la proteína permanezca funcional.

15 Las expresiones “resto” o “resto de aminoácido” o “aminoácido” incluyen referencia a un aminoácido que está incorporado en una proteína, un polipéptido o péptido (en su conjunto “péptido”). El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural y, a menos que se limite de otra manera, puede incluir análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a la de los aminoácidos de origen natural.

Los aminoácidos y análogos indicados en el presente documento se describen mediante abreviaturas como se indica en la Tabla A:

Tabla A: Nomenclatura de los aminoácidos

Nombre	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Homoserina	Hse	-
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Metionina sulfóxido	Met (O)	-
Metionina metilsulfonio	Met (S-Me)-	-
Norleucina	Nle	-
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

20 Una “sustitución conservativa”, cuando se describe una proteína, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera sustancialmente la actividad de la proteína. Por tanto, las “variaciones conservativamente modificadas” de un secuencia de aminoácidos particular, se refieren a sustituciones de aminoácidos de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad de la proteína o la sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácidos, básicos, cargados positiva o negativamente, polares o no polares, etc.) de tal manera que las sustituciones de aminoácidos incluso
 25 críticos no alteren sustancialmente la actividad. En la técnica se conocen tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Cada uno de los siguientes seis grupos de la Tabla B contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

Tabla B

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Véase también, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W. H. Freeman and Company, Nueva York (2ª Ed., 1992).

5 Los términos “conjugación”, “unión”, “enlace” o “ligamiento” se refieren a la creación de dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua. En el contexto de la presente divulgación, los términos incluyen referencia a la unión de un residuo de anticuerpo con una molécula efectora (ME). El ligamiento puede ser por medios químicos o recombinantes. Los medios químicos significa que se refiere a una reacción entre la fracción del anticuerpo y la molécula efectora de tal manera que se forma un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula.

10 Como se utiliza en el presente documento, “recombinante” incluye referencia a una proteína producida utilizando células que no tienen, en su estado natural, una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante porque se han modificado genéticamente por la introducción de la secuencia de ácidos nucleicos aislada apropiada. El término también incluye referencia a una célula, o a un ácido nucleico, o a un vector, que se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la modificación de un ácido nucleico natural en una forma no natural para esa célula, o que la célula que procede de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no han encontrado en la forma natural (no recombinante) de las células, expresan mutantes de genes que se encuentran en la forma natural, o expresan genes naturales que, de otra manera, se expresan de forma anómala, se infraexpresan o no se expresan del todo.

20 Como se utiliza en el presente documento, “ácido nucleico” o “secuencia de ácidos nucleicos” incluye referencia a un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma monocatenaria o bicatenaria, y a menos que se limite de otra manera, incluye análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan con ácidos nucleicos de una manera similar a la de los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otra manera, una secuencia de ácidos nucleicos particular incluye su secuencia complementaria, así como variantes conservativas, es decir, ácidos nucleicos presentes en posiciones fluctuantes de codones y variantes que, cuando se traducen en una proteína, dan como resultado una sustitución conservativa de un aminoácido.

30 Como se utiliza en el presente documento, “codificar”, con respecto a un ácido nucleico especificado, incluye referencia a ácidos nucleicos que comprenden la información para la traducción en la proteína especificada. La información se especifica mediante el uso de codones. Normalmente, la secuencia de aminoácidos está codificada por el ácido nucleico, utilizando el código genético “universal”. Sin embargo, pueden utilizarse variantes del código universal, tales como las presentes en algunas mitocondrias de plantas, animales y hongos, la bacteria *Mycoplasma capricolum* (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 2306-2309 (1985)), o el ciliado *Macronucleus*, cuando el ácido nucleico se expresa utilizando la maquinaria traduccional de estos organismos.

35 La frase “fusión en fase” se refiere a la unión de dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de tal manera que la secuencia de ácidos nucleicos unida se traduce en una proteína monocatenaria (“proteína de fusión”) que comprende las cadenas polipeptídicas originales.

Como se utiliza en el presente documento, “expresado” incluye referencia a la traducción de un ácido nucleico en una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, llegar a ser un componente de la membrana de la superficie celular o secretarse en la matriz o medio extracelular.

40 Por “célula hospedadora” se entiende una célula que puede soportar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procariontas, tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibio o mamífero.

45 Los términos “idénticas” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para una máxima correspondencia, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual.

La frase “sustancialmente idénticas”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de nucleótidos o de restos de aminoácidos al menos 60 %,

más preferentemente 65 %, incluso más preferentemente 70 %, aún más preferentemente 75 %, incluso más preferentemente 80 % y lo más preferentemente 90-95 %, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Preferentemente, existe una identidad sustancial sobre una región de las secuencias que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 restos, más preferentemente sobre una región de una longitud de al menos aproximadamente 100 restos, y lo más preferentemente las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 restos. En una realización más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de un péptido de comparación o de regiones codificantes.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, y posteriormente se diseñan coordenadas de secuencias, si fuera necesario, y se diseñan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa diseñados.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informatizada de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual (véase, en líneas generales, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel y col., eds., Current Protocols, una sociedad conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para la determinación del porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y en Altschuel y col. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente. El programa informático para realizar análisis BLAST se encuentra disponible al público en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP, del inglés *high scoring sequence pairs*) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia a investigar, que se emparejan o cumplen algunas puntuaciones de umbral T (*threshold*) de valor positivo, cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de bases de datos. El valor de T hace referencia al umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul y col, citado anteriormente). Este acierto de palabra vecina inicial actúa como semilla iniciando búsquedas para encontrar los HSP más largos que la contiene. Los aciertos de palabras se extienden después en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos emparejados; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no emparejados; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión del acierto de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación del alineamiento acumulativa disminuye por la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa va de cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o cuando se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programan BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como ajustes por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como ajustes por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual se produciría un emparejamiento fortuito entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con respecto al ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferentemente menor que aproximadamente 0,01 y los más preferentemente menor que aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en cruzado con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más adelante. Por tanto, en general, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente por las sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos secuencias se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación.

La expresión "*in vivo*" incluye referencia al interior del cuerpo del organismo del cual se obtuvo la célula. "*Ex vivo*" e "*in vitro*" significa fuera del cuerpo del organismo del cual se obtuvo la célula.

La frase "célula maligna" o "neoplasia" se refiere a tumores o a células tumorales que son invasivas y/o capaces de experimentar metástasis, es decir, una célula cancerosa.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, las "células de mamífero" incluyen referencia a células procedentes de mamífero, entre los que se incluyen, seres humanos, ratas, ratones, cobayas, chimpancés o macacos. Las células pueden cultivarse *in vivo* o *in vitro*.

Con respecto a un antígeno, la expresión "selectivamente reactivo", se refiere a la asociación preferencial de un anticuerpo, en su totalidad o en parte, con una célula o un tejido que lleva ese antígeno y no con células o tejidos que carecen de ese antígeno. Por supuesto, se reconoce que puede producirse un cierto grado de interacción inespecífica entre una molécula y una célula o un tejido no diana. Sin embargo, la reactividad selectiva puede distinguirse como mediada a través del reconocimiento específico del antígeno. Aunque los anticuerpos selectivamente reactivos se unen al antígeno, estos pueden hacerlo con baja afinidad. Por otra parte, la unión específica produce una asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo y las células que llevan el antígeno que entre el anticuerpo unido y las células que carecen del antígeno. En general, la unión específica produce un aumento de más de 5 veces, más preferentemente de más de diez veces y lo más preferentemente de más de 100 veces, la cantidad de anticuerpo unido (por unidad de tiempo) a una célula o tejido que lleva el antígeno diana en comparación con una célula o un tejido que carece del antígeno diana. La unión específica a una proteína en dichas condiciones requiere un anticuerpo que se seleccione por su especificidad por una proteína particular. Una variedad de formatos de inmunoensayo son apropiados para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos de tipo ELISA en fase sólida se utilizan habitualmente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica véase Harlow & Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988).

La expresión "condiciones inmunológicamente reactivas" incluye la referencia a condiciones que permiten que un anticuerpo generado contra un epítipo particular se una a ese epítipo a un grado detectablemente mayor que, y/o con la exclusión sustancial de, unión a sustancialmente los restantes epítipos. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión a anticuerpo y normalmente son las utilizadas en protocolos de inmunoensayo o aquellas condiciones encontradas *in vivo*. Véase Harlow & Lane, citado anteriormente, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo. Preferentemente, las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los procedimientos en la presente divulgación son "condiciones fisiológicas" que incluyen referencia a condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolalidad, pH) que son típicas dentro de un mamífero vivo o de una célula de mamífero viva. Aunque se reconoce que algunos órganos están sometidos a condiciones extremas, el medio dentro del organismo e intracelular normalmente se encuentra a un pH de aproximadamente 7 (es decir, un pH de 6,0 a 8,0, más normalmente un pH de 6,5 a 7,5), contiene agua como disolvente predominante, y está a una temperatura por encima de 0 °C y por debajo de 50 °C. La osmolalidad está dentro del intervalo que da soporte a la viabilidad y proliferación celular.

Los términos "paciente", "sujeto", "individuo" se refieren indistintamente a un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un primate no humano, un animal doméstico (por ejemplo, un canino o felino), un mamífero agrícola (por ejemplo, un bovino, porcino, ovino, equino), un animal de laboratorio (un ratón, una rata, un hámster, un conejo).

El término "coadministrar" se refiere a la presencia simultánea de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Los agentes activos que se coadministran pueden suministrarse de manera simultánea o secuencial.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratando" y "tratamiento", se refieren a retrasar la aparición de, retardar o invertir el progreso de, o aliviar o prevenir la enfermedad o la afección a la que se aplica el término, o uno o más síntomas de dicha enfermedad o afección.

Los términos "inhibición", "reducción"; "disminución" con respecto al crecimiento o progresión de un tumor o cáncer, se refieren a la inhibición del crecimiento, propagación, metástasis de un tumor o cáncer en un sujeto mediante una cantidad medible utilizando cualquier método conocido en la técnica. El crecimiento, la progresión o la propagación de un tumor o cáncer se inhibe, reduce o disminuye si la carga tumoral se reduce al menos en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 80 %, o 100 % en comparación con la carga tumoral antes de la coadministración de una PE, descrita en el presente documento, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica. En algunas realizaciones, el crecimiento, la progresión o propagación de un tumor o cáncer se inhibe, reduce o disminuye al menos aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o más en comparación con la carga tumoral antes de la administración de la PE.

55 Componentes de las inmunotoxinas recombinantes.

A. Sitios de escisión de furina (FCS, *Furin Cleavage Sites*)

El sitio de escisión de furina puede ser cualquier sitio polipeptídico escindible por furina. Como informan Duckert y

- col., *Protein Engineering, Design & Selection* 17(1):107-112 (2004) (en lo sucesivo, "Duckert y col."), la furina es una enzima en una "familia de serina proteasas dependiente de CA²⁺ dibásicas y monobásicas específicas evolutivamente conservada denominada proproteín convertasas similares a subtilisina/hexina". Id., en página 107. La furina, también conocida como "enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados" o "PACE", es una de
- 5 siete miembros de la familia de mamíferos y está implicada en el procesamiento de diversas proteínas humanas endógenas. Véase, en líneas generales, por ejemplo, Thomas G, *Nat Rev Mol Cell Biol*, (10):753-66 (2002). Es una proteína asociada a membrana encontrada principalmente en la red trans-Golgi. La secuencia de la furina humana se conoce desde principios de 1990. Véase, por ejemplo, Hatsuzawa, K. y col., *J. Biol Chem.*, 267:16094-16099 (1992); Molloy, S. y col., *J. Biol. Chem.*, 267:16396-16402 (1992).
- 10 El sitio de escisión mínima es normalmente, según el código de una letra para los restos de aminoácidos, R-X-X-R, produciéndose la escisión después de la segunda "R". Duckert y col. resumen la información disponible sobre las secuencias de 38 proteínas descritas en la bibliografía que tienen sitios de escisión de furina, incluyendo proteínas de mamífero, proteínas de bacterias patógenas y proteínas de virus. Se describe que el 31, o el 80 %, de los motivos de escisión revisados tenían la secuencia consenso R-X-[R/K]-R, de los cuales, el 11, o el 29 %, tenían R-X-R-R, y
- 15 el 20, o el 52 %, eran R-X-K-R. Tres de los motivos de escisión contenían solo la secuencia de escisión mínima. Duckert y col., también alinearon los motivos e identificaron los restos encontrados en cada posición en cada furina tanto para el propio motivo de escisión como para los restos circundantes. La Figura 1A de Duckert y col., muestra por tamaño relativo los restos más comúnmente encontrados en cada posición. Por convención, los restos que rodean el sitio de escisión de furina están numerados desde el enlace escindible (que normalmente se indica con el
- 20 símbolo '↓'). Contando hacia el extremo N, los restos sustrato se denominan P1, P2 y así sucesivamente, mientras que contando hacia el extremo C, los restos se denominan P1', P2', y así sucesivamente. Véase, por ejemplo, Rockwell, N. C., y J. W. Thorner, *Trends Biochem. Sci.*, 29:80-87 (2004); Thomas G., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3:753-766 (2002). De este modo, siguiendo la convención, se puede utilizar la siguiente secuencia para alinear y numerar los restos de la secuencia de escisión mínima y los restos circundantes:
- 25 P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5',
- en la que la secuencia de escisión mínima de furina se numera como P4-P1. La alineación de Duckert y col. de 38 secuencias escindidas por furina identifica las variaciones permitidas dependiendo de los restos presentes en diversas posiciones. Por ejemplo, si el resto en P4 no es una R, que puede compensarse por tener restos de arginina o lisina en P2 y P6. Id., en página 109.
- 30 En la PE natural, la escisión de furina se produce entre la arginina 279 y la glicina 280 en un bucle rico en arginina situado en el dominio 2 de la toxina. La secuencia de escisión de furina natural en el dominio II de PE se expone más adelante (indicando los números las posiciones de los restos en la secuencia de PE natural de 613 aminoácidos) y se alineándose para mostrar su numeración según la convención indicada anteriormente:
- 274- R H R Q P R G W E Q L -284 (SEQ ID NO:17)
- 35 P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5'
- En estudios subyacentes a la presente divulgación, se realizaron sustituciones en las posiciones P3 y P2 para formar la siguiente secuencia, subrayando las sustituciones:
- 274- R H R S K R G W E Q L -284 (SEQ ID NO:29).
- 40 Esta secuencia ha mostrado una velocidad de escisión más rápida que la de la secuencia natural, y cuando se utilizó en una inmunotoxina ejemplar produjo una citotoxicidad a células diana aproximadamente igual que la de la secuencia natural.
- Basándose en este estudio y en nuestros estudios previos, la secuencia de escisión de furina utilizada para unir la molécula diana al dominio III de PE puede ser la secuencia de escisión mínima de furina, R-X-X-R, o cualquiera de las otras secuencias de escisión de furina conocidas en la técnica o permitidas en la Figura de Duckert y col., a
- 45 condición de que, si hay un resto presente en la posición identificada como P2', este debe ser triptófano o, si no es triptófano, debe ser valina o alanina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia puede ser RKKR (SEQ ID NO:30), RRRR (SEQ ID NO:31), RKAR (SEQ ID NO:32), SRVARS (SEQ ID NO:33), TSSRKRRFW (SEQ ID NO:34), o ASRRKARSW (SEQ ID NO:35).
- Como se observa en Duckert y col., puede utilizarse un resto menos favorable que R (principalmente valina) en la
- 50 posición P4 si se compensa con restos de arginina o lisina en las posiciones P2 y P6, de manera que al menos dos de los tres restos en P2, P4 y P6 sean básicos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia escindible de furina es RRVKKRFW (SEQ ID NO:36), RNVVRRDW (SEQ ID NO:37) o TRAVRRRSW (SEQ ID NO:38). El resto en la posición P1 puede ser la arginina presente en la secuencia natural, o lisina. De este modo, una lisina puede sustituirse por la arginina en la posición P1, por ejemplo, en cualquiera de las secuencias expuestas anteriormente.
- 55 En algunas realizaciones, la secuencia de la secuencia escindible de furina sigue la secuencia de la secuencia escindible furina de PE: R-H-R-Q-P-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO:15) o una versión truncada de la secuencia natural,

siempre que contenga la secuencia de escisión mínima de furina y sea escindible por furina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia escindible de furina puede ser R-Q-P-R (SEQ ID NO:39), R-H-R-Q-P-R-G-W (SEQ ID NO:40), R-H-R-Q-P-R-G-W-E (SEQ ID NO:41), H-R-Q-P-R-G-W-E-Q (SEQ ID NO:42), o R-Q-P-R-G-WE (SEQ ID NO:43). En algunas realizaciones, la secuencia es R-H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO:29) o una versión truncada de esta secuencia, siempre que contenga la secuencia de escisión mínima de furina y sea escindible por furina. Por tanto, en algunas realizaciones, la secuencia escindible de furina puede ser R-S- K-R (SEQ ID NO:44), R-H-R-S-K-R-G-W (SEQ ID NO:45), H-R-S-K-R-G-W-E (SEQ ID NO:46), R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO:47), H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO:48), o R-H-R-S-K-R (SEQ ID NO:49). Cualquier secuencia particular escindible de furina puede ensayarse fácilmente haciéndolo en una inmunotoxina con el anticuerpo utilizado en SS1-LR y ensayando la inmunotoxina resultante *in vitro* en una línea celular de mesotelina+.

El que una secuencia particular sea escindible o no por furina puede determinarse por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el que una secuencia sea escindible o no por furina puede ensayarse incubando la secuencia con furina en tampón de furina (NaOAc 0,2 M (pH 5,5), CaCl₂ 5 mM) a 1:10 proporción molar de enzima: sustrato de 1:10 a 25 °C durante 16 horas. Estas condiciones se han establecido previamente como óptimas para la escisión por furina de PE. Preferentemente, la furina que se utiliza es furina humana. La furina humana truncada recombinante está disponible en el comercio, por ejemplo, en New England Biolabs (Beverly, MA). Véase también, Bravo y col., J Biol Chem, 269(14):25830-25837 (1994). Los sitios de escisión de furina adecuados se enseñan también en una publicación de patente PCT número WO 2009/032954, publicada el 12 de marzo de 2009).

B. Dominio III funcional

Estructuralmente, se entiende que el dominio Ib comprende los restos 365-399. Por otro lado, como se indica en el presente documento, aunque se considera que el límite estructural del dominio de III de PE comienza en el resto 405, análisis funcionales han mostrado que el dominio III requiere un segmento de dominio Ib estructural para conservar la actividad de ADP-ribosilación. Por consiguiente, el dominio III funcional se define como los restos 395-613 de PE, y por tanto se prefiere que las toxinas de la divulgación comprendan los restos 395-613 de PE, con determinadas variaciones permitidas descritas más adelante. La delección de los restos 365-394 distintos de los de la secuencia de escisión de furina, es deseable, ya que las delecciones eliminan cualquiera de los epítomos inmunogénicos presentes en estas porciones de la molécula de PE. En las PE de la divulgación, una secuencia de escisión de furina, (o variantes truncadas o modificadas de la misma), se une en su extremo carboxilo con el dominio III, que tiene intercalado entre los dos un enlazador flexible de 3 a 8 aminoácidos independientemente seleccionados de glicina y serina.

En realizaciones preferidas, el dominio funcional de las moléculas de PE se modifica para tener una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de los restos de aminoácidos normalmente presentes en las posiciones D406 y Q592 dentro del dominio III. Las sustituciones en las posiciones D406 y Q592 pueden combinarse con sustituciones de alanina, glicina, serina o glutamina en las posiciones R432, R467, R490, R513, E548 y K590 dentro del dominio III. En algunas realizaciones, además, al menos un resto de aminoácido correspondiente a un resto de aminoácido en una posición seleccionada de D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 se sustituye con una alanina, glicina, serina o glutamina. Las sustituciones en los restos en sustituciones de posiciones dentro del dominio III de las posiciones de restos de aminoácidos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 del dominio III. En algunas realizaciones, el dominio III funcional de PE es sustancialmente idéntico a, o es idéntico, a la secuencia de aminoácidos del dominio funcional de SS1-LR/GGS/8M de PE. En algunas realizaciones, el dominio III funcional de PE es sustancialmente idéntico a, o es idéntico, a la secuencia de aminoácidos del dominio funcional de SS1-LR/GGS/8X de PE.

Se entiende que la secuencia natural de PE y las variantes analizadas anteriormente pueden tener sustituciones conservativas y conservar la capacidad citotóxica y, deseablemente, antigenicidad reducida en comparación con la secuencia natural de PE. En realizaciones preferidas, variantes modificadas de PE o sus fragmentos citotóxicos tienen una similitud de secuencia de al menos 80 %, preferentemente una similitud de secuencia de al menos 85 %, más preferentemente una similitud de secuencia de al menos 90 %, y lo más preferentemente una similitud de secuencia de al menos 95 % al nivel de aminoácidos, con el dominio III funcional de PE de interés, el de SS1-LR/GGS/8M o SS1-LR/GGS/8M. La publicación PCT No WO/2011/032022 publicada el 17 de marzo de 2011 desvela mutaciones adecuadas que reducen la antigenicidad del dominio II funcional de PE.

La expresión "variantes modificadas de manera conservativa" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o si el ácido nucleico no codifica ninguna secuencia de aminoácidos, a secuencias de ácidos nucleicos esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido determinado. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede cambiarse por cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones del ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. En el presente documento cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cualquier posible

variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en un ácido nucleico cada codón (salvo AUG, que normalmente es el único codón para la metionina) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

- 5 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteren, añadan o delecionen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada, es una “variante modificada de manera conservativa” en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido similar desde el punto de vista químico.

10 **Ensayo de citotoxicidad o antigenicidad de PE**

Las exotoxinas de *Pseudomonas* empleadas en la divulgación pueden someterse a ensayo para determinar el nivel de citotoxicidad deseado mediante ensayos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, los fragmentos citotóxicos de PE y las variantes de dichos fragmentos modificadas de manera conservativa pueden someterse fácilmente a ensayos para determinar su citotoxicidad. Un gran número de moléculas de PE candidatas pueden someterse a ensayo simultáneamente para determinar su citotoxicidad por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, subgrupos de las moléculas candidatas pueden someterse a ensayo para determinar su citotoxicidad. Los subgrupos de las moléculas candidatas que reaccionan positivamente pueden subdividirse continuamente y volverlos a someter a ensayo hasta identificar el fragmento (o fragmentos) citotóxico deseado. Dichos procedimientos permiten explorar rápidamente un gran número de fragmentos citotóxicos o variantes conservativas de PE. La antigenicidad se puede someter a ensayo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo los ensayos enseñados en el documento WO 2007/016150.

C. Anticuerpos antimesotelina

El componente de direccionamiento de la molécula quimérica se une específicamente al marcador de superficie celular, la mesotelina. Los antígenos de superficie celular, que son dianas para moléculas quiméricas, son muy conocidos en la técnica, y se resumen, por ejemplo, en Mufson, *Front Biosci* (2006) 11: 337-43; Frankel, *Clin Cancer Res* (2000) 6: 326-334 y Kreitman, *AAPS Journal* (2006) 8(3): E532- E551. Como ejemplos de cánceres cuyo crecimiento, propagación y/o progresión puede reducirse o inhibirse por direccionamiento a mesotelina se incluye cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino y cáncer pancreático. En otra realización preferida, el residuo de direccionamiento es un fragmento de anticuerpo, preferentemente un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie en una célula. Un fragmento de anticuerpo preferido es un Fv monocatenario. En el presente documento se describe la construcción y caracterización de inmunotoxinas basadas en citotoxina, en las que la citotoxina se fusiona a un scFv (sc del inglés *single chain* que significa monocatenario). Otros fragmentos de anticuerpo preferidos con los que puede fusionarse una toxina o un fragmento citotóxico incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, un anticuerpo estabilizado con hélice, un diacuerpo, un anticuerpo estabilizado con disulfuro y un anticuerpo de un solo dominio (por ejemplo, un anticuerpo de camélido). Los anticuerpos contra mesotelina incluyen SS1, SSP1, HN1, HN2, MN, K1 y variantes de los mismos. MORAb-009 (una versión humanizada de SS1) es un anticuerpo particularmente adecuado.

Se ha demostrado que el anticuerpo SS1P destruye específicamente líneas celulares que expresan mesotelina y produce regresiones de tumores que expresan mesotelina en ratones (Hassan, R. y col., *Clin Cancer Res* 8: 3520-6 (2002); Onda, M. y col., *Cancer Res* 61: 5070-7 (2001)). Basándose en estos estudios y en datos de seguridad apropiados, se están realizando 2 ensayos clínicos de fase I con SS1P en el Instituto Nacional del Cáncer en pacientes con cánceres que expresan mesotelina (Chowdhury, P. S. y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 669-74 (1998); Hassan, R y col., *Proc Am Soc Clin Oncol* 21: 29a (2002)).

45 Además, otras terapias dirigidas a la mesotelina están en desarrollo preclínico (Thomas, A. M. y col., *J Exp Med* 200: 297-306 (2004)). HN1 y HN2 son anticuerpos antimesotelina humanos, descritos, por ejemplo, en Feng y col., *Mol Cancer Ther* (2009) 8(5): 1113-8. Las inmunotoxinas de SS1P donde se han eliminado grupos de escisión para proteasas lisosómicas. Estas variantes se describen, por ejemplo, en Weldon, y col., *Blood*, (2009) 113(16): 3792-800 y en el documento WO 2009/032954.

50 Las ITR de la divulgación incluyen, pero sin limitación, moléculas en las que hay un enlace covalente de una molécula de PE con un anticuerpo u otro agente de direccionamiento. La fusión de una citotoxina con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se produce normalmente en un extremo C del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Dicha fusión se realiza normalmente empleando tecnologías de ADN recombinante. La elección de un agente de direccionamiento particular depende de la célula particular a la que se dirige. Los anticuerpos que dirigen la inmunotoxina pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes, tales como quimeras o fragmentos de región variable. Si el anticuerpo no es recombinante, la inmunotoxina debe formarse por conjugación química del anticuerpo con el residuo citotóxico. Si el anticuerpo se produce de manera recombinante, el anticuerpo puede unirse a la toxina a través de enlace químico o a través de fusión recombinante. En la fusión recombinante, el ADNc que codifica el anticuerpo se inserta, en fase, en un plásmido que ya contiene el ADNc que codifica la toxina.

Por supuesto, puede realizarse a la inversa también; el ADNc de la toxina puede insertarse en un plásmido que lleva el ADNc que codifica el anticuerpo. Debido al posible gran tamaño de la inmunotoxina, a veces se desea unir solo un fragmento de un anticuerpo al residuo tóxico. Los fragmentos Fab, Fab' y F(ab)₂ se pueden crear a partir de anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos y después unirse a la toxina a través de un enlace químico.

5 Como alternativa, puede producirse un ADNc en el que las regiones variables de un anticuerpo están conectadas con regiones marco conservadas esenciales. Estos anticuerpos más pequeños se secretan después como anticuerpos Fv bicatenarios o, si las regiones de cadena pesada y ligera se unen, ya sea directamente o a través de un enlazador peptídico, como anticuerpos Fv monocatenarios (scFv). En la publicación de patente PCT n.º WO/2000/073346, publicada el 7 de diciembre de 2000, se desvelan anticuerpos y fragmentos de mesotelina particularmente preferidos, en los que se eliminan grupos de escisión para proteasas lisosómicas.

Un procedimiento para crear un scFv es a través de bibliotecas de presentación en fagos creadas a partir de ARNm esplénico de ratones inmunizados con un inmunógeno (Chowdhury y col., Mol. Immunol. 34: 9-20 (1997)). Sin embargo, si un inmunógeno proteico se encuentra de manera natural en mamíferos pero se expresa de manera recombinante en procariontes, la proteína no tendrá el patrón de glucosilación correcto y puede que no tenga la conformación correcta. Los anticuerpos desarrollados por el ratón en respuesta a este inmunógeno no pueden reconocer la proteína en su estado natural. Una solución a este problema es inmunizar a los animales con la proteína natural creada en células de mamífero, pero puede no ser posible la purificación de células de mamífero en cantidades suficientes de algunas proteínas, en particular proteínas de la superficie celular. Otra solución, aunque no tan común, es inmunizar a los animales con el ADNc que codifica al inmunógeno. El ADNc, bajo el control de un promotor apropiado, se introduce en el animal. Después de inyecciones de refuerzo y cuando el título de anticuerpos alcanza un máximo, los animales se sacrifican y se extirpan los bazo para crear la biblioteca de presentación en fagos. Inmunizando a los ratones con plásmidos que contienen el ADN que codifica la mesotelina, es posible suscitar altos títulos de anticuerpos antimmesotelina. Utilizando el ARN esplénico y la tecnología de presentación en fagos, se puede aislar un Fv monocatenario ("scFv"), que denominamos SS scFv, que se une con alta afinidad a la mesotelina.

Los anticuerpos antimmesotelina para su uso en la presente divulgación pueden unirse al FCS (sitio de escisión de furina) a través del extremo amino de FCS. De manera similar, el FCS puede unirse directamente a las regiones pesada, ligera, Fc (región constante) o marco conservadas del anticuerpo. La unión puede producirse a través del extremo amino o carboxilo del anticuerpo, o a través de un resto interior de aminoácido. Los anticuerpos que se utilizan en una composición de inmunocombinado multivalente de la presente divulgación pueden dirigirse a los mismos, o a diferentes, epítopos de mesotelina.

En realizaciones preferidas de la presente divulgación, el anticuerpo antimmesotelina es un anticuerpo recombinante tal como un scFv o un anticuerpo Fv estabilizado con disulfuro. Los anticuerpos Fv tienen aproximadamente 25 kDa y contienen un sitio de unión a antígeno completo con 3 CDR por cadena pesada y ligera. Si la cadena V_H y la cadena V_L se expresan de manera no contigua, las cadenas del anticuerpo Fv se sujetan normalmente entre sí por interacciones no covalentes. Sin embargo, estas cadenas tienden a disociarse tras la dilución, por lo que se han desarrollado procedimientos para reticular las cadenas a través de glutaraldehído, disulfuros intermoleculares, o un enlazador peptídico.

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo es un Fv monocatenario (scFv). Las regiones V_H y V_L de un anticuerpo scFv comprenden una sola cadena que se pliega para crear un sitio de unión a antígeno similar al encontrado en anticuerpos bicatenarios. Una vez plegadas, las interacciones no covalentes estabilizan el anticuerpo monocatenario. En una realización más preferida, el scFv se produce de forma recombinante. Un experto se dará cuenta de que pueden crearse variantes conservativas de los anticuerpos de la presente divulgación. Dichas variantes conservativas empleadas en fragmentos scFv conservarán restos de aminoácidos críticos necesarios para plegar y estabilizar correctamente entre las regiones V_H y V_L. En algunas realizaciones de la presente divulgación, el anticuerpo scFv está directamente unido al FCS a través de la cadena ligera.

Aunque las regiones V_H y V_L de algunas realizaciones de anticuerpos pueden unirse directamente entre sí, un experto apreciará que las regiones pueden separarse con un enlazador peptídico que consiste en uno o más aminoácidos. Los enlazadores peptídicos y su uso son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Huston, y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8: 5879 (1988); Bird, y col., Science 242: 4236 (1988); Glockshuber, y col., Biochemistry 29: 1362 (1990); patente de Estados Unidos n.º 4.946.778; la patente de Estados Unidos 5.132.405 y Stemmer y col., Biotechniques 14: 256-265 (1993).

Generalmente, el enlazador peptídico tendrá actividad biológica inespecífica aparte de unirse a las regiones o preservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, pueden seleccionarse aminoácidos constituyentes del enlazador peptídico para ejercer influencia sobre alguna propiedad de la molécula tal como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobicidad. Los anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) incluyen opcionalmente un enlazador peptídico de no más de 50 aminoácidos, generalmente de no más de 40 aminoácidos, preferentemente de no más de 30 aminoácidos y más preferentemente de no más de 20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico es un concatámero de la secuencia Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 50), preferentemente 2, 3, 4, 5 o 6 de dichas secuencias. Sin embargo, debe apreciarse que se pueden hacer algunas sustituciones de aminoácidos dentro del enlazador. Por ejemplo, una valina puede sustituirse por una

glicina.

Preferentemente, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera del anticuerpo mutado, teniendo el polipéptido una afinidad de unión al menos 5 veces más alta por un antígeno que un anticuerpo parental, teniendo el polipéptido una secuencia que difiere de la del anticuerpo parental mediante una sustitución de aminoácidos de al menos un aminoácido en una región determinante de complementariedad (CDR), estando el aminoácido codificado por un codón que comprende un nucleótido que pertenece a un motivo de punto caliente seleccionado de AGY o RGYW, en el que R es A o G, Y es C o T y W es A o T. La sustitución puede ocurrir en la CDR3 de una región variable de cadena ligera o pesada. La sustitución puede ocurrir en la CDR1 o CDR2 de una región variable de cadena ligera o pesada. En algunas realizaciones, el anticuerpo antimesotelina es un material de anticuerpo desvelado en la patente de Estados Unidos n.º 7.081.518 expedida el 25 de julio de 2006.

El anticuerpo antimesotelina puede comprender una cadena pesada variable ("V_H") y una cadena ligera variable ("V_L"), teniendo cada una de las cadenas V_H y V_L una primera, una segunda y una tercera región determinante de complementariedad ("CDR"), en la que la primera CDR ("CDR1"), la segunda CDR ("CDR2") y la tercera CDR ("CDR3"), respectivamente, de dicha cadena pesada, tiene la secuencia de restos de aminoácidos mostrada para la CDR1 (GYTMN; SEQ ID NO: 51), la CDR2 (LITPYNGASSYNQKFRG; SEQ ID NO: 52) y la CDR3 (GGYDGRGFDY; SEQ ID NO: 53) y en la que las CDR 1, 2 y 3 respectivamente, de dicha cadena V_L, tiene la secuencia de restos de aminoácidos mostrada para la CDR1 (SASSSVSYM; SEQ ID NO: 54), la CDR2 (DTSKLAS; SEQ ID NO: 55) y CDR3 (QQWSGYPLT; SEQ ID NO: 56). En algunas realizaciones, la CDR3 de la cadena ligera se modifica y tiene la secuencia QQWSKHPLT (SEQ ID NO: 57), QQWSGHPLT (SEQ ID NO: 58), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 59), QQWS-QIPLT (SEQ ID NO: 60), QQWGFNPLT (SEQ ID NO: 61), QQWGTNPLT (SEQ ID NO: 62), QQWGSHPPLT (SEQ ID NO: 63), QQWGDFFPLT (SEQ ID NO: 64), QQWGDHPLT (SEQ ID NO: 65), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 66) o QQWS-GYPTT (SEQ ID NO: 67). En algunas realizaciones, la V_H está conectada a la V_L mediante un péptido enlazador, GVGGSG₄SG₄S (SEQ ID NO: 25). En algunas realizaciones adicionales, el anticuerpo antimesotelina es un scFv, dsFv, a Fab o un F(ab')₂. En algunas otras realizaciones adicionales, el anticuerpo antimesotelina a utilizar en la ITR comprende una sustitución de aminoácido de al menos un aminoácido en una CDR seleccionada del grupo que consiste en CDR1 V_L, CDR2 V_L, CDR1 V_H y CDR2 V_H, estando dicho aminoácido codificado por un codón que comprende un nucleótido que pertenece a un motivo de punto caliente seleccionado de AGY o RGYW, en el que R es A o G, Y es C o T y W es A o T.

30 D. L1

El anticuerpo está unido al FCS por un enlazador adicional que es preferentemente un enlace o un polipéptido de 1 a 10 aminoácidos contiguos de longitud. En algunas realizaciones, este enlazador tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos. En algunas realizaciones preferidas, el enlazador consiste en restos de glicina y serina. En algunas realizaciones adicionales el enlazador es ASGG (SEQ ID NO: 19) o ASGGSGGG (SEQ ID NO: 68). En realizaciones preferidas, el enlazador forma una cadena polipeptídica continua que une directamente un extremo carboxilo del anticuerpo al extremo N del FCS.

E. El enlazador flexible

El enlazador flexible acopla directamente el FCS al dominio III funcional de PE. El enlazador flexible es un péptido continuo de fórmula (Xaa1)_n en la que cada Xaa1 se selecciona independientemente de glicina y serina y n varía de 3 a 8. En realizaciones preferidas, n es 3. En una realización más preferida, el enlazador es GGS. En otras realizaciones, n es 4, 5, 6 o 7. En otras realizaciones, el enlazador flexible es GGGG (SEQ ID NO: 50), GGGSG (SEQ ID NO: 69), GGGSGG (SEQ ID NO: 70) o GGSGGS (SEQ ID NO: 18).

El enlazador flexible se fusiona en secuencia al extremo C del FCS y se fusiona directamente en secuencia al dominio funcional III de PE y, por consiguiente, forma una cadena peptídica continua con el FCS y el dominio III funcional.

Producción de inmunocombinados

i. Procedimientos no recombinantes

En una realización no recombinante de la divulgación, una molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo, se une a una molécula de PE de la presente divulgación usando cualquier número de medios conocidos por los expertos en la técnica. Con las moléculas de PE de la presente divulgación pueden utilizarse medios de unión tanto covalentes como no covalentes.

El procedimiento para unir una molécula de PE con un anticuerpo o con otra molécula de direccionamiento ("TM", *targeting molecule*) variará de acuerdo con la estructura química de la TM. Los polipéptidos contienen normalmente una diversidad de grupos funcionales, por ejemplo, grupos de ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo, por ejemplo, para dar como resultado la unión de la molécula de PE.

Como alternativa, el anticuerpo u otra TM se derivatiza para exponer o para unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazadoras, tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

5 Un "enlazador", tal y como se utiliza en el presente documento, es una molécula que se utiliza para unir la TM a la molécula de PE. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con la molécula efectora. Los enlazadores adecuados son muy conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína). Sin embargo, en una realización preferida, los enlazadores se unirán a los grupos alfa carbono amino y carboxilo de los aminoácidos terminales.

10 En algunas circunstancias, cuando el inmunoconjugado ha alcanzado su sitio diana, es deseable liberar la molécula de PE de la TM. Por lo tanto, en estas circunstancias, los inmunoconjugados comprenderán enlaces que puedan escindirse cerca del sitio diana. La escisión de enlazador para liberar la molécula de PE de la TM puede estimularse por actividad enzimática o con condiciones a las que se somete el inmunoconjugado ya sea dentro de la célula diana o cerca del sitio diana. Cuando el sitio diana es un tumor, puede utilizarse un enlazador que sea escindible en las condiciones presentes en el sitio del tumor (por ejemplo, cuando se expone a enzimas asociadas a tumores o a un pH ácido).

ii. Procedimientos recombinantes

20 Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado incluyendo, por ejemplo, clonación de secuencias apropiadas o mediante síntesis química directa por procedimientos tales como el procedimiento con fosfotriéster de Narang, y col., Meth. Enzymol. 68:90-99 (1979); el procedimiento con dietilfosforamidita de Beaucage, y col., Tetra. Lett. 22:1859-1862 (1981); el procedimiento con fosforamidita triéster en fase sólida descrito por Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862 (1981), por ejemplo, utilizando un sintetizador automatizado como se describe, por ejemplo, en Needham-VanDevanter, y col. Nucl. Acids Res. 12:6159-6168 (1984); y el procedimiento con soporte sólido de la patente de Estados Unidos N.º 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este puede convertirse en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con un ADN polimerasa, utilizando como molde la cadena sencilla. Un experto reconocerá que, aunque la síntesis química de ADN está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas por ligamiento de secuencias más cortas.

35 En una realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos de la presente divulgación se preparan por técnicas de clonación. Se encuentran ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación apropiadas, e instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación, en Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), Berger and Kimmel (eds.), GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, Academic Press, Inc., San Diego CA (1987)), o en Ausubel, y col. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY (1987). También proporciona información útil la información de los productos de fabricantes de reactivos biológicos y de equipo experimental. Dichos fabricantes incluyen la compañía química SIGMA (Saint Louis, MO), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen, San Diego, CA, y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como otras muchas fuentes comerciales conocidas por el experto en la técnica.

45 Los ácidos nucleicos que codifican la PE natural también pueden modificarse para formar los inmunoconjugados descritos en el presente documento. La modificación por mutagénesis dirigida es muy conocida en la técnica. Los ácidos nucleicos que codifican la PE pueden amplificarse por procedimientos *in vitro*. Los procedimientos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), el sistema autosostenido de replicación de secuencias (3SR). Los expertos en la materia conocen una amplia variedad de procedimientos de clonación, células hospedadoras y metodologías de amplificación *in vitro*.

55 En una realización preferida, los inmunoconjugados se preparan insertando el ADNc que codifica un anticuerpo, u otra TM de elección, en un vector que comprende el ADNc que codifica una PE deseada de la divulgación. La inserción se realiza de tal manera que el agente de direccionamiento (para facilitar el análisis, el análisis del presente documento supondrá que el agente de direccionamiento es un Fv, aunque otros agentes de accionamiento podrían sustituirse con el mismo efecto) y la PE están en fase de lectura, esto es, en un polipéptido continuo que contiene una región Fv funcional y una región PE funcional. En una realización particularmente preferida, el ADNc que codifica una PE de la divulgación se liga a un scFv, de tal manera que la toxina se localiza en el extremo carboxilo del scFv. En otras realizaciones preferidas, el ADNc que codifica una PE de la divulgación se liga a un scFv de tal manera que la toxina se localiza en el extremo amino del scFv.

60

Una vez que los ácidos nucleicos que codifican una PE, un anticuerpo, o un inmunoconjugado de la presente invención, se aíslan y clonan, se puede expresar la proteína deseada en una célula modificada por ingeniería genética de manera recombinante, tal como una célula de bacteria, planta, levadura, insecto y mamífero. Se espera que los expertos en la técnica sean conocedores de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas, incluyendo *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, células de levadura y diversas células eucariotas superiores, tales como las líneas de células COS, CHO, HeLa y de mieloma. No se intentará describir con detalle los diversos procedimientos conocidos para la expresión de proteínas en procariontes o eucariotas. En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican las proteínas aisladas de la divulgación se realizará normalmente uniendo operativamente el ADN o el ADNc con un promotor (que es constitutivo o inducible), seguido de la incorporación en un casete de expresión. Los casetes pueden ser adecuados para la replicación e integración en procariontes o en eucariotas. Los casetes de expresión típicos contienen terminadores de la transcripción y de la traducción, secuencias iniciadoras y promotores útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Para obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte que dirija la transcripción, un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli* esto incluye un promotor, tal como los promotores T7, trp, lac o lambda, un sitio de unión a ribosoma y preferentemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y preferentemente un potenciador procedente de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus y una secuencia de poliadenilación, y puede incluir secuencias donadoras yceptoras de corte y empalme. Los casetes de la divulgación pueden transferirse al interior de la célula hospedadora seleccionada por procedimientos muy conocidos, tales como transformación con cloruro de calcio o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para células de mamífero. Las células transformadas por los casetes pueden seleccionarse por resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los casetes, tales como los genes *amp*, *gpt*, *neo* e *hyg*.

Un experto reconocerá que en un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente divulgación (es decir, una PE o un inmunoconjugado formado a partir de una PE de la divulgación) podrán realizarse modificaciones sin disminuir su actividad biológica. Para facilitar la clonación, la expresión o la incorporación de la molécula de direccionamiento en una proteína de fusión, pueden realizarse algunas modificaciones. Dichas modificaciones son muy conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, aminoácidos adicionales colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción convenientemente localizados, o aminoácidos adicionales (tales como poli His) para ayudar en las etapas de purificación.

Además de con procedimientos recombinantes, los inmunoconjugados y las PE de la presente divulgación también pueden construirse en su totalidad o en parte utilizando síntesis peptídica convencional. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de la presente divulgación, de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, puede realizarse uniendo el aminoácido C terminal de la secuencia a un soporte insoluble seguido de adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Se describen técnicas de síntesis en fase sólida en Barany & Merrifield, THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY. VOL. 2: SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS, PART A. págs. 3-284; Merrifield, y col. J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156 (1963), y en Stewart, y col., SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2ª ED., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Las proteínas de mayor longitud pueden sintetizarse por condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Los expertos en la técnica conocen procedimientos de formación de enlaces peptídicos por activación de un extremo terminal carboxilo (por ejemplo, utilizando el reactivo de acoplamiento N, N'-diciclohexilcarbodiimida).

iii. Purificación

Una vez expresados, los inmunoconjugados recombinantes y las PE de la presente divulgación, pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna y similar (véase, en general, R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos una homogeneidad de aproximadamente 90 a 95%, prefiriéndose más las que tienen una homogeneidad de 98 a 95% o más, para los usos farmacéuticos. Una vez purificadas, parcialmente o, si se desea, hasta la homogeneidad, si van a utilizarse terapéuticamente, los polipéptidos deben carecer sustancialmente de endotoxina.

Se han descrito procedimientos para la expresión de anticuerpos monocatenarios y/o repliegamiento en una forma activa apropiada, incluyendo anticuerpos monocatenarios, de bacterias tales como *E. coli* y se conocen bien y son aplicables a los anticuerpos de esta divulgación. Véase, Buchner, y col., Anal. Biochem. 205:263-270 (1992); Pluckthun, Biotechnology 9:545 (1991); Huse, y col., Science 246:1275 (1989) and Ward, y col., Nature 341:544 (1989).

A menudo, las proteínas heterólogas funcionales de *E. coli*, o de otras bacterias, se aíslan de cuerpos de inclusión y requieren solubilización utilizando desnaturalizantes fuertes y posterior repliegamiento. Durante la etapa de solubilización, como se sabe bien en la técnica, debe haber un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un tampón ejemplar con un agente reductor es: Tris 0,1 M pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2mM, DTE (ditioeritritol) 0,3 M. La reoxidación de los enlaces disulfuro puede producirse en presencia de reactivos de tior de bajo peso molecular

y en forma recudida y oxidada, como se describe en Saxena, y col., *Biochemistry* 9: 5015-5021 (1970), y como describen especialmente Buchner, y col., citados anteriormente.

La renaturalización se realiza normalmente por dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida en un tampón de replegamiento. Un tampón ejemplar es Tris 0,1 M, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8mM y EDTA 2mM.

Como una modificación en el protocolo de purificación de un anticuerpo bicatenario, las regiones de las cadenas pesada y ligera se solubilizan y se reducen por separado y después se combinan en una solución de replegamiento. Se obtiene un rendimiento preferido cuando estas dos proteínas se mezclan en una relación molar de tal manera que no se supere un exceso molar de 5 veces de una proteína sobre la otra. Es deseable añadir un exceso de glutatión oxidado u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular a la solución de replegamiento después de finalizar el intercambio redox.

2. Composiciones farmacéuticas y administración

En un aspecto de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica o un medicamento que comprende al menos una proteína quimérica descrita en el presente documento, preferentemente una toxina dirigida, y adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica o un medicamento pueden administrarse a un paciente para el tratamiento de una afección, incluyendo, pero sin limitación, una enfermedad neoplásica o un cáncer.

a. Formulación

Las composiciones farmacéuticas o medicamentos para su uso en la presente divulgación pueden formularse por técnicas convencionales utilizando uno o más transportadores o excipientes fisiológicamente aceptables. En el presente documento se describen transportadores farmacéuticos aceptables se describen en el presente documento así como en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins (2005). Las proteínas quiméricas de la presente divulgación pueden formularse para su administración mediante cualquier vía adecuada, incluyendo la vía por inhalación, tópica, nasal, oral, parenteral o rectal. Por tanto, la administración de la composición farmacéutica puede realizarse mediante inyección intradérmica, subdérmica, intravenosa, intramuscular, intranasal, inhalatoria, intracerebral, intratraqueal, intraarterial, intraperitoneal, intravesicular, intrapleural, intracoronaria, subcutánea o intratumoral, con una jeringa u otros dispositivos. También puede contemplarse la administración transdérmica, al igual que la administración mediante inhalación o aerosol. Los comprimidos y cápsulas pueden administrarse por vía oral, rectal o vaginal.

Para su administración, las composiciones comprenderán normalmente una solución de la proteína quimérica, preferentemente una toxina dirigida, disuelta en un transportador farmacéuticamente aceptable, preferentemente un transportador acuoso. Pueden utilizarse diversos transportadores acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similar. Estas soluciones son estériles y generalmente carecen de materia no deseable. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes ajustadores de pH y agentes tampón, agentes ajustadores de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y lactato de sodio y similares. La concentración de la proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes líquidos, de las viscosidades, del peso corporal y similar de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y con las necesidades del paciente.

Las composiciones de toxina dirigida de la presente divulgación son idóneas para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa o administración en una cavidad corporal.

Las proteínas quiméricas, preferentemente toxinas dirigidas, de la presente divulgación, pueden formularse para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones inyectables son preferentemente suspensiones o soluciones isotónicas acuosas y los supositorios se preparan preferentemente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de su uso. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con procedimientos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente y contienen aproximadamente de 0,1 a 75%, preferentemente aproximadamente de 1 a 50%, de principio activo.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones de toxina dirigida de la presente divulgación, pueden fabricarse como implantes, inyecciones oleaginosas o como sistemas de partículas. Para una visión más general de sistemas de suministro de proteínas véase, Banga, A.J., *THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS*, Technomic Publishing Company, Inc.,

Lancaster, PA, (1995). Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas el agente terapéutico se dispersa a través de la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas más pequeñas de aproximadamente 1 μm se denominan generalmente nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 μm de tal manera que solo se administran nanopartículas por vía intravenosa. Las micropartículas tienen normalmente un diámetro de alrededor de 100 μm y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter J., COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, págs. 219-342 (1994); and Tice & Tabibi, TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, págs. 315-339 (1992).

Para liberación controlada con iones de las composiciones de toxina dirigida de la presente divulgación pueden utilizarse polímeros. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en la administración de fármaco en el suministro controlado de fármacos (Langer R., *Accounts Chem. Res.*, 26:53. Por ejemplo, el copolímero en bloque, poloxamer 407 existe como un líquido con movilidad, incluso viscoso a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y suministro sostenido de interleucina-2 recombinante y ureasa (Johnston y col., *Pharm. Res.*, 9:425-434 (1992); y Pec y col., *J. Parent. Sci. Tech.*, 44(2):58-65 (1990)). Como alternativa, como un microtransportador para la liberación controlada de proteínas se ha utilizado hidroxiapatita (Ijntema y col., *Int. J. Pharm.*, 112:215-224 (1994)). En otro aspecto más, se utilizan liposomas para la liberación controlada, así como para el direccionamiento de fármacos encapsulados en lípidos (Betageri y col., *LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Para el suministro controlado de proteínas terapéuticas se conocen numerosos sistemas adicionales. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5,055,303, 5,188,837, 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, 4,957,735 y 5,019,369, 5,055,303; 5,514,670; 5,413,797; 5,268,164; 5,004,697; 4,902,505; 5,506,206, 5,271,961; 5,254,342 y 5,534,496.

Las formulaciones adecuadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad eficaz de una composición de la presente divulgación con un transportador. Los transportadores preferidos incluyen disolventes absorbibles farmacológicamente aceptables para ayudar a pasar a través de la piel del hospedador. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en forma de un vendaje que comprende un elemento de refuerzo, un depósito que contiene la composición opcionalmente con transportadores, opcionalmente una barrera que controla la velocidad para suministrar la composición en la piel del hospedador a una velocidad controlada y predeterminada durante un periodo de tiempo prolongado, y medios para fijar el dispositivo a la piel. También pueden utilizarse formulaciones transdérmicas de tipo matriz.

Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica, por ejemplo, en la piel y ojos, son preferentemente soluciones acuosas, pomadas, cremas o geles muy conocidos en la técnica. Estas pueden contener agentes solubilizantes, estabilizantes, potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

Para la administración oral, una composición farmacéutica o un medicamento pueden tener forma, por ejemplo, de un comprimido o una capsula, preparados por medios convencionales con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se prefieren comprimidos y cápsulas de gelatina que comprendan el principio activo, es decir, una composición de la presente divulgación, junto con (a) diluyentes o cargas, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa (por ejemplo, etilcelulosa, celulosa microcristalina), glicina, pectina, poliácridatos y/o hidrogenofosfato de calcio, sulfato de calcio, (b) lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio, estearatos metálicos, dióxido de silicio coloidal, aceite vegetal hidrogenado, almidón de maíz, benzoato de sodio, acetato de sodio y/o polietilenglicol; para comprimidos también, (c) aglutinantes, por ejemplo, silicato de aluminio o magnesio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetil celulosa de sodio, polivinilpirrolidona y/o hidroxipropil metil celulosa; si se desea (d) disgregantes, por ejemplo, almidones (por ejemplo, almidón de patata o almidón de sodio), glicolato, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; (e) agentes humectantes, por ejemplo, lauril sulfato sódico y/o (f) absorbentes, colorantes, saporíferos y edulcorantes.

Los comprimidos pueden recubrirse con una película o con un recubrimiento entérico de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tener forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse con un producto deshidratado para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agentes de suspensión, por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina o goma arábiga; vehículos no acuosos tales como, por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleaginosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados; y conservantes, por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico. Las separaciones también pueden contener sales tampón, saporíferos, colorantes y/o edulcorantes según sea apropiado. Si se desea, las preparaciones para administración oral pueden formularse adecuadamente para proporcionar una liberación controlada de la composición activa.

Para la administración por inhalación de la proteína quimérica, preferentemente un anticuerpo y/o toxina dirigida pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o desde un nebulizador, utilizando un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano,

5 tricolorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, 1,1,1,2- tetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla en polvo de la proteína quimérica, preferentemente un anticuerpo o una toxina dirigida y una base en polvo adecuada, por ejemplo, lactosa o almidón.

Las composiciones también pueden formularse en composiciones rectales, por ejemplo, supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan bases para supositorio convencionales, por ejemplo, manteca de cacao u otros glicéridos.

10 Además, las composiciones pueden formularse como una preparación de medicamento de absorción lenta (*depot*). Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, la composición puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o en resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

15 Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que pueda contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contengan el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, por ejemplo, un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede contener instrucciones para la administración.

b. Dosificación

20 En una realización de la presente divulgación, a un paciente se le administra una composición farmacéutica o un medicamento a una dosis terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar o controlar una enfermedad o afección neoplásica, tal como un cáncer. La composición farmacéutica o el medicamento se administran a un paciente en una cantidad suficiente para suscitar una respuesta terapéutica o de diagnóstico eficaz en el paciente. Una respuesta terapéutica o de diagnóstico eficaz es una respuesta que al menos detiene o retarda, al menos parcialmente, los síntomas o complicaciones de la enfermedad o afección neoplásica. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz".

30 La dosificación de las proteínas quiméricas, preferentemente toxinas dirigidas, o composiciones administradas, depende de la especie del animal de sangre caliente (mamífero) del peso corporal, de la edad, de la afección individual, del área de superficie a tratar y de la forma de administración. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y grado de cualquiera de los efectos adversos que acompañan a la administración de un compuesto particular en un sujeto particular. Una dosificación unitaria para la administración a un mamífero de aproximadamente 50 a 70 kg puede contener entre aproximadamente 5 y 50 mg del principio activo. Normalmente, una dosificación del compuesto de la presente divulgación, es una dosificación que es suficiente para conseguir los efectos deseados.

35 A partir de mediciones de la proteína quimérica, preferentemente acumulación en el cuerpo de un sujeto de la toxina dirigida, pueden calcularse pautas de dosificación óptimas. En general, la dosificación varía de 1ng a 1.000 mg por kg de peso corporal y puede darse una o más veces al día, a la semana, al mes o al año. Los expertos habituales en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Un experto en la técnica será capaz de determinar la dosificación óptima para la administración de una proteína quimérica, preferentemente una toxina dirigida, a un ser humano después de establecer protocolos conocidos en la técnica y en la divulgación del presente documento.

40 Las dosificaciones óptimas, toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones pueden variar dependiendo de la fuerza relativa de las composiciones individuales y pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos de células o en animales experimentales, por ejemplo, determinando la LD₅₀ (la dosis letal al 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción, DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren las composiciones que presentan índices terapéuticos grandes. Aunque pueden utilizarse composiciones que presenten efectos secundarios tóxicos, hay que tomar precauciones a la hora de diseñar un sistema suministro que dirija dichas composiciones al lugar del tejido afectado para minimizar posibles daños a células normales y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

50 Los datos obtenidos, por ejemplo, de estudios con animales (por ejemplo, roedores y monos) pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de los compuestos de la presente divulgación se encuentra preferentemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar en este Intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración. Para cualquier composición para su uso en los procedimientos de la divulgación, la dosis terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Puede formularse una dosis en modelos con animales para obtener un Intervalo de concentración plasmática en circulación que incluya la CI₅₀ (la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición

media máxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar, con mayor precisión, dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En general, la dosis equivalente de una proteína quimérica, preferentemente de una toxina dirigida, es de aproximadamente 1 ng/kg a 100 mg/kg para un sujeto normal.

5 Una composición normal de toxina dirigida de la presente invención, para administración intravenosa, sería de aproximadamente 0,1 a 10mg por paciente al día. Pueden utilizarse dosificaciones de 0,1 a aproximadamente 1.000 mg por paciente al día. Los procedimientos actuales para la preparación de composiciones administrables son conocidos o son obvios para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Lippencott
10 Williams & Wilkins (2005).

Como ejemplos de dosis de las composiciones descritas en el presente documento se incluyen cantidades de miligramos y microgramos de la composición por kilogramo de sujeto o peso de muestra (por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o de
15 aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo. También se entiende que las dosis apropiadas de una composición dependen de la fuerza de la composición con respecto al efecto deseado que va a conseguirse. Cuando una o más de estas composiciones van a administrarse a un mamífero, un médico, un veterinario o investigador puede prescribir, por ejemplo, una dosis inicial relativamente baja y aumentar posteriormente la dosis hasta que se obtenga una respuesta apropiada. Además, se entiende que el
20 nivel de dosis específico para cualquier sujeto mamífero particular dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad de la composición específica empleada, la edad, peso corporal, estado general, sexo y dieta del sujeto, el tiempo y vía de administración, tasa de excreción, cualquier combinación de fármaco y del grado de expresión o de actividad a modular.

En una realización de la presente divulgación, una composición farmacéutica o medicamento comprende una
25 proteína quimérica, preferentemente una toxina dirigida de la presente divulgación, se administra, por ejemplo, en una dosis diaria en el intervalo de aproximadamente 1mg de compuesto por kg de peso del sujeto (1 mg/kg) a aproximadamente 1 g/kg. En otra realización, la dosis es una dosis en el intervalo de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg. En otra realización más, la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente
30 150 mg/kg. Una dosis preferida es de aproximadamente 10 mg/kg. La dosis diaria puede administrarse una vez al día o puede dividirse en subdosis y administrarse en dosis múltiples, por ejemplo, dos veces, tres veces o cuatro veces al día. Sin embargo, como apreciará un experto en la técnica, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en cantidades diferentes a tiempos diferentes. El experto en la técnica también apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y temporización, necesarias para tratar
35 eficazmente un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o la afección neoplásica, tratamientos previos, estado general y/o el sexo del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un solo tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

Después de un tratamiento satisfactorio, puede ser deseable que el sujeto se mantenga bajo terapia para impedir la
40 recurrencia de la enfermedad o afección neoplásica tratada.

c. Administración

Las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad o afección neoplásica, tal como cáncer, en una cantidad suficiente para curar o detener al menos parcialmente a la enfermedad y sus
45 complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado de salud general del paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es aquella que proporciona el alivio subjetivo de uno o más síntomas o una mejora objetivamente identificable observada por el médico u otro observador cualificado.

La determinación de una cantidad eficaz se encuentra bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento. Generalmente, una cantidad eficaz o efectiva de un inmunoconjugado se determina administrando primero una dosis baja o una pequeña cantidad del inmunoconjugado y después aumentando crecientemente la dosis o dosificaciones administradas, añadiendo un segundo o un tercer medicamento según sea necesario, hasta que se observe un efecto deseado en el sujeto tratado con efectos secundarios mínimos o no tóxicos.
50

Las administraciones sencillas o múltiples de las composiciones se administran dependiendo de la dosificación y frecuencia que necesite y tolere el paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cantidad suficiente de proteínas de la presente divulgación para tratar de un modo eficaz al paciente. Preferentemente, la dosis se administra una vez pero puede aplicarse periódicamente hasta que se consiga un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifiquen la suspensión de la terapia. Generalmente, la dosis es suficiente para
55

tratar o mejorar síntomas o signos de enfermedad sin producir una toxicidad inaceptable al paciente.

Para conseguir el efecto terapéutico deseado, las composiciones pueden administrarse durante varios días a una dosis diaria terapéuticamente eficaz. Por tanto, la administración terapéuticamente eficaz de las composiciones para tratar en un sujeto una enfermedad o afección neoplásica descrita en el presente documento puede requerir la administración periódica (por ejemplo, diaria) que continúa durante un periodo de tiempo que varía de tres días a dos semanas o más. Normalmente, las composiciones se administrarán durante al menos tres días consecutivos, a menudo durante al menos cinco días consecutivos, más a menudo durante al menos diez días, y algunas veces, durante 20, 30, 40 o más días consecutivos. Aunque una ruta preferida sea dosis diarias consecutivas para conseguir una dosis terapéuticamente eficaz, puede obtenerse un efecto terapéuticamente eficaz incluso si los compuestos o composiciones no se administran diariamente, siempre que la administración se repita con suficiente frecuencia para mantener una concentración terapéuticamente eficaz de las composiciones en el sujeto. Por ejemplo, puede administrarse una composición cada dos días, cada tres días o, si se emplean intervalos de dosis más elevadas y el sujeto las tolera, una vez a la semana.

3. Procedimientos de inhibición del crecimiento tumoral

Las composiciones de la presente divulgación se utilizan de diversas maneras. Por ejemplo, las moléculas de PE de la presente divulgación, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, se utilizan para (i) inducir la apoptosis en una célula que lleva uno o más marcadores de superficie, (ii) inhibir el crecimiento, la hiperproliferación o la supervivencia indeseados de una célula que lleva uno o más marcadores de superficie celular, (iii) tratar una afección, tal como cáncer y (iv) proporcionar terapia a un mamífero que ha desarrollado una enfermedad causada por la presencia de células que llevan uno o más marcadores de superficie celular.

Cualquier célula o célula tumoral que exprese mesotelina como un marcador de superficie celular puede utilizarse para llevar a la práctica un procedimiento de la presente divulgación. Los procedimientos en la presente divulgación pueden llevarse a la práctica *in vitro* o *in vivo*. Cuando se hace referencia a una célula, se entiende que este término también incluye una población de células, es decir, más de una célula.

Uso de composiciones para inducir la apoptosis en una célula que lleva uno o más marcadores de superficie celular

La apoptosis desempeña un papel crucial tanto en el desarrollo como en la homeostasis de organismos multicelulares. La "apoptosis" se refiere a muerte celular programada y se caracteriza por determinadas características celulares, tales como membrana informe, condensación y fragmentación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y un patrón de tinción "TUNEL" (marcado del extremo libre por UTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal) positivo. Una etapa posterior en el proceso apoptótico es la degradación de la membrana plasmática, que hace que las células apoptóticas sean permeables a diversos colorantes (por ejemplo, yoduro de propidio).

La apoptosis puede inducirse mediante rutas de señalización independientes múltiples que convergen sobre un mecanismo efector final que consta de interacciones múltiples entre diversos receptores de muerte y sus ligandos, que pertenecen a la superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral (TNF)/ligando. Los receptores de muerte mejor caracterizados son CD95 ("Fas"), TNFR1 (p55), el receptor de muerte 3 (DR3 o Apo3/TRAMO), DR4 y DR5 (apo2-TRAIL-R2). El mecanismo efector final de la apoptosis es la activación de una serie de proteinasas denominadas caspasas. La activación de estas caspasas produce la escisión de una serie de proteínas celulares vitales y la muerte celular.

La presente divulgación proporciona procedimientos para inducir la apoptosis en una célula que expresa mesotelina. En un aspecto, el procedimiento para inducir la apoptosis en una célula, comprende la etapa de exponer o poner en contacto la célula que expresa mesotelina, como un marcador de superficie celular, con una ITR de la presente divulgación. Normalmente, las células se exponen o se ponen en contacto con cantidades eficaces del inmunoconjugado, en el que la puesta en contacto produce la inducción de la apoptosis.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento de inducción de una célula tumoral que expresa mesotelina en su superficie para experimentar apoptosis, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una ITR de la presente divulgación.

Uso de composiciones para inhibir el crecimiento, la hiperproliferación o la supervivencia de una célula lleva uno o más marcadores de superficie celular

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar estrategias terapéuticas mejoradas para el tratamiento de cánceres utilizando las composiciones de la divulgación. En un aspecto de la presente divulgación, se describe un procedimiento para inhibir al menos un crecimiento, hiperproliferación o supervivencia no deseados de una célula. Este procedimiento comprende la etapa de poner en contacto una célula que exprese mesotelina, como un marcador de superficie, con una cantidad eficaz de una PE de la presente divulgación, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, como se describe en el presente documento, en el que la etapa de poner en contacto produce la inhibición de al menos uno de crecimiento, hiperproliferación o supervivencia indeseable de la célula. En

una realización, este procedimiento comprende la etapa de determinar si la célula expresa uno o más marcadores de superficie celular, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Normalmente, las células se exponen o se ponen en contacto con cantidades eficaces del inmunocombinado, en el que la puesta en contacto produce la inhibición de al menos uno de crecimiento, hiperproliferación o supervivencia indeseable de la célula.

5 Por tanto, en un aspecto de la presente divulgación, se describen procedimientos de inhibición del crecimiento de una población de células que llevan mesotelina. En un aspecto preferido, este procedimiento comprende las etapas de (a) poner en contacto una población de células con una proteína quimérica de acuerdo con la invención. Muchos tumores forman metástasis. Por tanto, en otro aspecto de la presente divulgación, las composiciones de la misma se utilizan en un procedimiento de prevención de la formación de una metástasis. Este procedimiento comprende la
10 etapa de administrar a una célula tumoral una composición de la presente divulgación en la que la administración produce la prevención de la metástasis. En un aspecto preferido, la composición comprende una toxina dirigida que comprende un anticuerpo contra un antígeno de superficie celular y una PE de la presente divulgación. Normalmente, las células se exponen a, o se ponen en contacto con, cantidades eficaces del inmunocombinado, en el que la puesta en contacto produce la prevención de la metástasis. Como ejemplos de cánceres cuyo crecimiento, propagación y/o progresión puede inhibirse incluyen cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer de pulmón no
15 microcítico, adenocarcinoma de pulmón y cáncer pancreático.

Los procedimientos de la presente divulgación pueden llevarse a la práctica *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, en otro aspecto de la presente divulgación, se describe un procedimiento para el tratamiento de un sujeto que padece una
20 afección cancerosa. Este procedimiento comprende la etapa de administrar a un sujeto, al que se le ha diagnosticado un cáncer, cantidades terapéuticamente eficaces de la ITR de la divulgación, en el que la afección cancerosa se caracteriza por un crecimiento o una proliferación indeseable de una célula que expresa uno o más marcadores de superficie celular y en el que la etapa de administrar produce el tratamiento del sujeto. Normalmente, las células se exponen o se ponen en contacto con cantidades eficaces de la inmunotoxina, en el que la puesta en contacto produce el tratamiento del sujeto.

25 En un aspecto de la presente divulgación, una inmunotoxina que comprende una PE de la presente divulgación es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer mediado por la interacción de unión mesotelina-CA125. Como ejemplos de cánceres cuyo crecimiento, propagación y/o progresión están mediados, al menos parcialmente, por la unión de CA125/mesotelina se incluyen cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y cáncer pancreático.

30 Los procedimientos para el tratamiento del cáncer pueden comprender opcionalmente una o más de las siguientes etapas: obtención de una muestra biológica de tejido o fluido de un individuo; exploración de la muestra biológica para la expresión de mesotelina, a través de la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo dirigido contra el marcador de superficie o la exploración de la muestra biológica para la expresión del polinucleótido marcador de superficie detectando un ARNm marcador de superficie. Esto puede realizarse utilizando técnicas
35 convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, transferencia Western, transferencia Northern o PCR.

Uso de composiciones para el tratamiento de un sujeto que ha desarrollado una enfermedad causada por la presencia de células que llevan uno o más marcadores de superficie celular

También se describe un procedimiento que proporciona terapia a un mamífero que ha desarrollado una enfermedad
40 causada por la presencia o proliferación aberrante de células que preferentemente llevan o sobreexpresan mesotelina. En un aspecto preferido, este procedimiento comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una ITR de la divulgación. Normalmente, las células se exponen a, o se ponen en contacto con, cantidades eficaces de la inmunotoxina, dando como resultado el contacto el tratamiento del sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona la eliminación de células diana *in vitro* o *ex vivo* utilizando las
45 ITR de la presente divulgación. Por ejemplo, las moléculas quiméricas que comprenden las ITR de la divulgación pueden utilizarse para eliminar células diana de una población de células en el cultivo. Por tanto, células cultivadas, por ejemplo, de un paciente que tiene un cáncer que expresa mesotelina, pueden eliminarse de células cancerosas poniendo en contacto el cultivo con moléculas quiméricas dirigidas contra mesotelina, como se describe en el presente documento.

En algunos, las células diana pueden estar incluidas en una muestra biológica. Una "muestra biológica", como se
50 utiliza en el presente documento, es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene células diana y células no diana. Dichas muestras incluyen, pero sin limitación, tejido de biopsia, sangre y células sanguíneas (por ejemplo leucocitos). Normalmente, una muestra biológica se obtiene de un eucariota multicelular, preferentemente un mamífero tal como una rata, un ratón, una vaca, un perro, una cobaya, un conejo y más preferentemente un primate, tal como un macaco, chimpancé o ser humano. Más preferentemente la muestra es de un ser humano.

Procedimientos de monitorización de la respuesta al tratamiento con una ITR de la invención

La divulgación describe procedimientos de detección de la inhibición del crecimiento tumoral en un paciente que
55 padece, o que es susceptible a un cáncer que puede tratarse con una ITR de la divulgación. Los procedimientos son particularmente útiles para la monitorización de un ciclo de tratamiento que se administra a un paciente utilizando las

ITR descritas en el presente documento. Los procedimientos pueden utilizarse para monitorizar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos.

5 Los procedimientos de monitorización conllevan determinar un valor inicial de carga tumoral en un paciente antes de administrar una dosificación de las ITR descritas en el presente documento y comparar este valor con un valor de la carga tumoral después del tratamiento, o con la carga tumoral en un paciente que no recibe tratamiento.

Una disminución significativa (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación típica de la media de dichas mediciones) en el valor de la carga tumoral indica un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración de las ITR de la presente divulgación ha bloqueado la progresión del crecimiento y/o metástasis tumoral).

10 En otros procedimientos, se determina un valor de control (es decir, una desviación media y típica) de carga tumoral en una población de control o en una población normal (por ejemplo carga = cero). Normalmente, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de la carga tumoral en un paciente después de la administración de las ITR de la presente divulgación se comparan después con el valor de control.
15 Una disminución significativa en la carga tumoral con respecto al valor de control (por ejemplo, mayor que una desviación típica de la media) indica un resultado de tratamiento positivo. Una ausencia de disminución significativa o un aumento indica un resultado de tratamiento negativo.

20 En otros procedimientos, se determina un valor de control de carga tumoral (por ejemplo, una desviación media y típica) a partir de una población de control de individuos que se ha sometido a tratamiento recibiendo un régimen de las ITR descritas en el presente documento, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, como se describe en el presente documento. Los valores medidos de carga tumoral en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación típica) al del valor de control, el tratamiento puede interrumpirse. Si el nivel de carga tumoral en un paciente está significativamente por encima del valor de control, la administración continuada del agente está justificada.

25 En otros procedimientos, para determinar si se requiere reanudar el tratamiento, se monitoriza la carga tumoral de un paciente que no está actualmente recibiendo tratamiento, pero que se ha sometido a un ciclo de tratamiento previo. El valor de la carga tumoral medido en el paciente, puede compararse con un valor de carga tumoral previamente obtenido en el paciente después de un ciclo de tratamiento previo. Un aumento significativo en la carga tumoral con respecto a la medición previa (es decir, mayor que un margen de error típico en mediciones repetidas de la misma muestra) es indicativo de que el tratamiento puede reanudarse. Como alternativa, el valor medido en un
30 paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación típica) determinado en una población de pacientes después de someterse a un ciclo de tratamiento. Como alternativa, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen sin síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran una mejora de las características de la enfermedad. En todos estos casos, un aumento en la carga tumoral con respecto al nivel de
35 control (es decir, más de una desviación típica) es un indicador de que el tratamiento debe reiniciarse en un paciente.

40 La muestra de tejido para análisis es normalmente sangre, plasma, suero, moco, biopsia de tejido, tumor, ascitis o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra puede analizarse para indicios de neoplasia. La neoplasia o carga tumoral puede detectarse utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, observación visual de una biopsia por un patólogo cualificado, u otras técnicas de visualización, por ejemplo, radiografía, ultrasonido, obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).

KITS, ENVASES, DISPOSITIVOS Y SISTEMAS

45 Para el uso en las aplicaciones de diagnóstico, de investigación y terapéuticas, descritas anteriormente, la divulgación también proporciona kits y sistemas. Los kits de la presente divulgación comprenderán una ITR de la presente divulgación, por ejemplo, como parte de una molécula quimera. Además, los kits y los sistemas pueden incluir material de instrucciones que contienen pautas (es decir, protocolos) para la realización práctica de los procedimientos de esta divulgación. Las instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión, de diversas formas, pudiendo estar en el kit una o más de estas formas. Aunque el material de instrucciones normalmente comprende material escrito o impreso, dicho material no está limitado a esto. Cualquier medio que pueda almacenar
50 dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final se contempla en esta divulgación. Dichos medios incluyen, pero sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo discos magnéticos, cintas, cartuchos, microplacas), medios ópticos (por ejemplo CD ROM) y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan dichos materiales de instrucciones.

55 De acuerdo con la presente divulgación puede prepararse una amplia variedad de kits, sistemas y composiciones, dependiendo del usuario al cual esté destinado el kit y el sistema, y de las necesidades particulares del usuario.

Se proporcionan kits con dosis unitarias de la composición activa, por ejemplo, en dosis orales, vaginales, rectales, transdérmicas o inyectables (por ejemplo para inyección intramuscular, intravenosa o subcutánea). En dichos kits, además de los envases que contienen las dosis unitarias, habrá un prospecto con información que describe el uso y

los beneficios esperados de la composición, en el tratamiento de una enfermedad o afección neoplásica. Las composiciones activas y las dosis unitarias adecuadas son las descritas anteriormente en el presente documento.

Aunque la anterior divulgación se ha descrito con cierto detalle a modo ilustrativo y con ejemplos para su aclaración y entendimiento, será fácilmente obvio para un experto habitual en la materia, a la luz de las enseñanzas de la presente divulgación, que pueden realizarse en la misma ciertas variaciones, cambios, modificaciones y sustituciones de equivalentes sin apartarse necesariamente del ámbito de esta divulgación. Como resultado, las realizaciones descritas en el presente documento se someten a varias modificaciones, cambios y similares, dentro del ámbito de la presente divulgación que se determina exclusivamente por referencia a las reivindicaciones adjuntas en la misma. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse, alterarse o modificarse para producir esencialmente resultados similares. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es con el fin de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el ámbito de la presente divulgación estará limitado únicamente por las reivindicaciones que se adjuntan.

Aunque en el presente documento cada uno de los elementos de la presente divulgación se describe como que contiene realizaciones múltiples, debe entenderse que, a menos que se indique de otra manera, cada una de las realizaciones de un elemento determinado de la presente divulgación puede utilizarse con cada una de las realizaciones de los otros elementos de la presente divulgación y cada uno de dichos usos pretende formar una realización distinta de la presente divulgación.

Como puede apreciarse a partir de la divulgación anterior, la presente divulgación tiene una amplia variedad de aplicaciones.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos

Ejemplos

Proteínas

SS1P (SS1 (dsFv)-PE38) y todos los mutantes procedentes de SS1P se expresaron en *Escherichia coli* BL21 (ΔDE3) a partir de vectores para SS1 (VH)-PE y SS1 (VL), y posteriormente se replegó y purificó como se describe (Pastan I, Beers R y Bera TK, *Methods Mol Biol.*, 248: 503-18 (2004)). Se prepararon reservas de SS1P en Advanced BioScience Laboratories, Inc. (Kensington, MD). Todas las ITR restantes se prepararon en el Laboratory of Molecular Biology, National Cancer Institute (Bethesda, MD). Las mutaciones en SS1P se generaron utilizando mutagénesis dirigida de Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA) con cebadores de Lofstrand Labs Limited (Gaithersburg, MD).

Líneas celulares

En este estudio se utilizó una diversidad de líneas celulares procedentes de ser humano positivas a mesotelina. Las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón L55 y de mesotelioma M30 fueron proporcionadas por el doctor Steven Albelda, Universidad de Pennsylvania (Filadelfia, PA). La línea celular de mesotelioma HAY la proporcionó la Stehlin Foundation for Cancer Research (Houston TX). Las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-8 y A1847 las proporcionó el doctor Hisataka Kobayashi y el doctor S. Aaronson, respectivamente, del National Cancer Institute (Bethesda, MD). La línea celular de adenocarcinoma de pulmón NCI-H322M se obtuvo procedente del doctor Mitchell Ho del National Cancer Institute (Bethesda, MD). La línea celular KB31 es un subclón de la línea celular KB de carcinoma epidérmico humano (Akiyama S y col., *Somat Cell Mol Genet.*, 11(2): 117-26 (1985)). La línea celular A431/K5 es un derivado de la línea celular de carcinoma epidermoide A431 que se transfectó con mesotelina humana (Chowdhury PS y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95: 669-674 (1998)) y creció en medio esencial modificado de Dulbecco. (DMEM) complementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U, estreptomycin 100 µg y G-418 (geneticina) 750 µg/ml. A menos que se especifique otra cosa, todas las líneas celulares crecieron a 37°C con CO₂ al 5% en medio RPMI-1640 complementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U y estreptomycin 100 µg (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Ensayos de citotoxicidad

La viabilidad de las líneas celulares tratadas con inmunotoxinas se midió utilizando el ensayo de recuento celular con el Kit-8 WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) esencialmente como se describe en el manual técnico. En resumen, de 5.000 a 10.000 células/pocillo se sembraron en placas de 96 pocillos, se permitió la unión y se incubaron con diversas concentraciones de ITR durante 72 horas a un volumen final de 0,2 ml, después de lo cual se añadieron 10 µl del reactivo CCK-8 a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C hasta que los pocillos con la absorbancia máxima a 450 nm alcanzaron valores de DO de aproximadamente 1. Los valores se normalizaron entre la ciclohexamida (10 µg/ml) y los controles de tampón (seroalbúmina humana al 0,2 % en PBS) y se ajustó a una ecuación sigmoidea de 4 parámetros convencional con una pendiente variable utilizando el programa GraphPad PRISM para obtener la concentración de inmunotoxina a la cual había una muerte celular del 50 % (CE₅₀).

Se realizó un ensayo de viabilidad de células de pacientes con mesotelioma como se describe. En resumen, las células se obtuvieron de fluido pleural o de ascitis de pacientes con mesotelioma y se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en una placa de 24 pocillos con diversas concentraciones de las ITR SS1P, SS1-LR, BL22 (anti-CD22/PE38) como control negativo y HB21 (receptor de antitransferrina/PE38) como control positivo. Las células se incubaron durante 96 horas, se fijaron y se tiñeron con colorante violeta de cristal. La intensidad de color de cada pocillo se determinó con un lector de microplaca Versamax (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de 595 nm. Cada valor se determinó por triplicado. Se realizó un análisis estadístico de los datos resultantes mediante ANOVA utilizando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

10 **Ensayo antitumoral con xenoinjerto de ratón**

A veinticuatro ratones lampiños se les inyectó, por vía subcutánea en el costado, células A431/K5 el día 0, como se describe previamente (Zhang Y, Clin Cancer Res., 12(15): 4695-701 (2006)). El volumen tumoral se midió regularmente con un calibrador durante las 6 semanas siguientes. Cuando 5 días después del implante, el tamaño tumoral promedio alcanzó 100 mm^3 , los ratones se dividieron en cuatro grupos de seis y recibieron una inyección tres veces cada dos días (CDDX3) de 0,2 ml de MSA al 0,2 % en PBS (solo vehículo) o de vehículo que contenía SS1P (0,3 mg/kg) o SS1-LR (6,0 o 15 mg/kg). Los ratones se sacrificaban cuando sus tumores superaban 1.000 mm^3 o al final del experimento. Los animales se manipularon de acuerdo con las recomendaciones del National Institutes of Health aprobadas por el Animal Care and Use Committee of the National Cancer Institute.

Ensayo de internalización de ITR

20 Células A431/K5 (10^6 /pocillo) se sembraron en una placa de 6 pocillos (10 cm^2 /célula) y se dejaron incubando durante una noche. Al día siguiente, el medio de cada pocillo se reemplazó por 1 ml de medio reciente que contenía $1 \mu\text{g}$ de la ITR a evaluar. Las células se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante varios intervalos de tiempo, después de lo cual el pocillo se aclaró brevemente con 2 ml de PBS frío, 1 ml de tampón de separación frío (BSA 1 mg/ml en glicina 0,2 M, H 2,5) y de nuevo con 2 ml de PBS frío. Posteriormente, las células se sometieron a lisis tampón RIPA 200 μl (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1 %, desoxicolato Na al 0,5 %, SDS al 0,1 %, Tris-Cl 50 mM, pH 8,0) que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma, St. Louis, MO). Las muestras se analizaron mediante transferencia de Western SDS-PAGE con tris-glicina no reductora, utilizando un anticuerpo policlonal anti-PE38 de conejo.

Citotoxicidad variable de SS1-LR

30 Experimentos iniciales con SS 1-LR demostraron que tenía una citotoxicidad altamente variable con respecto a la de SS1P en una selección de líneas celulares que expresaban mesotelina, que variaba de más de 4 veces más activa a 20 veces menos activa. Sin embargo, la tendencia general era hacia una molécula menos activa. SS 1-LR era más del 20 % menos activa con respecto a SS1P en 5 de las 8 líneas celulares ensayadas, y únicamente mayor del 20 % más activa en una sola línea celular. Esta tendencia es notablemente diferente de la versión anti-CD22 de la molécula LR, HA22-LR, que normalmente demostró una citotoxicidad similar o aumentada en ambas líneas celulares y en células de pacientes (Weldon JE, Blood., 113(16): 3792-800 (2009)). Estas observaciones indican que hay una diferencia intrínseca entre la ruta de intoxicación de PE en células epiteliales que expresan mesotelina y en linfocitos B que expresan CD22.

Tabla 1. Resumen de citotoxicidad de SS1-LR

Línea celular	CE50 (ng/ml)		Actividad relativa
	SS1P	SS1-LR	
L55	5,32	4,66	1,14
NCI-H322M	0,63	1,80	0,35
HAY	4,79	1,05	4,56
KB31	0,47	9,34	0,05
M30	2,56	3,23	0,79
A431/K5	0,17	0,72	0,24
OVACR-8	1,40	4,13	0,34
A1847	4,59	4,70	0,98

Actividad de SS1-LR *in vitro*

La inmunotoxina SS1P (Fig 1A) consiste en Fv antimesotelina SS1 de dos cadenas estabilizado con disulfuro unido a PE38 (Chowdhury PS y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 95: 669-674 (1998); Chowdhury PS y Pastan I., Nat Biotechnol., 17: 568-572 (1999); Reiter Y y Pastan I., Clin. Cancer Res., 2: 245-252 (1996)). Se introdujo la mutación LR (Weldon JE, Blood., 113(16): 3792-800 (2009); PE Δ 251-273 y Δ 285-394) en SS1P para crear la variante SS1-LR (Fig 1B) y se evaluó su actividad en comparación con SS1P contra diversas líneas celulares que expresaban mesotelina *in vitro*. La Figura 2 muestra ensayos de citotoxicidad representativos para ocho líneas celulares diferentes.

La línea celular de cáncer de pulmón L55 (A) mostró sensibilidad similar en ambas ITR. Por otro lado, la línea de cáncer de pulmón NCI-H322M (Pal LH y col., Nat Med., 2(3): 350-3 (1996)) era aproximadamente 3 veces menos sensible a SS1-LR que a SS1P. La línea celular de mesotelioma HAY (G) fue mayor que 4 veces más sensible a SS1-LR que a SS1P, pero la línea de mesotelioma M30 (D) fue aproximadamente 20 % menos sensible a SS1P-LR. La línea celular A431/K5 (H), una línea epitelial transfectada de manera estable con mesotelina (Chowdhury PS y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 95: 669-674 (1998); Chang K y Pastan I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93,136-140 (1996)), era aproximadamente 4 veces menos sensible a SS1-LR en comparación con SS1P. Además, la línea de cáncer de cuello uterino KB31 (C) es susceptible a destrucción por SS1P, pero su CE₅₀ es 20 veces menor que la de SS1-LR. Las sensibilidades de las líneas celulares de cáncer de ovario A1847 (F) y OVCAR-8 (E) a SS1-LR también se evaluaron. SS1-LR mostró una CE₅₀ similar a la de SS1P en la línea A1847, pero una CE₅₀ 2 veces reducida en la línea OVCAR-8. La Tabla I resume estos datos y presenta los valores de CE₅₀ relativos comparando SS1P y SS1-LR. La actividad de SS1-LR con respecto a SS1P varía ampliamente entre las diferentes líneas celulares.

Cuando se analizan los datos, se observa que SS1-LR no reduce completamente la viabilidad de muchas de las líneas celulares evaluadas (NCI-H322M, KB31, M30, OVCAR-8 y A1847) a los niveles de control, como se define por células tratadas con ciclohexamida 10 μ g/ml. Esto sugiere que una subpoblación de células puede ser sensible a SS1P, pero resistente a SS1-LR. Se evaluó esta posibilidad incubando células OVCAR-8 y A 184 7 durante 4 días con 10 ng/ml de SS1-LR e intentando cultivar cualquier célula superviviente. No se observó crecimiento adicional de las células después de tratamiento con ITR. Se llegó a la conclusión de que, aunque en nuestro ensayo no se obtuvo inhibición metabólica completa, no había una subpoblación de estas líneas celulares que fuese resistente a SS1-LR.

Actividad de SS1-LR *in vivo*

A continuación se evaluó la eficacia de SS1-LR utilizando un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón. De las líneas celulares que se ensayaron *in vitro*, tan solo A431/K5 creció de modo consistente en nuestro modelo de xenoinjerto. Ratones lampiños con tumores de xenoinjerto A431/K5 alcanzaron un promedio de -100 mm³ cuando se trataron por vía intravenosa CDDX3 con SS1-LR a dosis de 6,0 o 15 mg/kg. Para comparación, se trataron grupos adicionales por vía intravenosa CDDX3 con tampón (HSA al 0,2 % en PBS) o con SS1P 0,3 mg/kg, la dosis tolerada máxima de SS1P con este régimen de dosificación. El tamaño tumoral de cada ratón se midió regularmente durante 22 días después del implante (Fig. 3).

Los tumores de los ratones tratados con PBS crecieron rápidamente hasta un tamaño promedio mayor de 1.000 mm³ el día 14 después del implante. Los ratones tratados los días 5, 7 y 9 con SS1P 0,3 mg/kg mostraron regresiones tumorales que alcanzaron el tamaño tumoral promedio a un mínimo de aproximadamente 53 mm³ el día 12. El día 20, todos los tumores habían reanudado un crecimiento rápido. La dosis de 6,0 mg/kg de SS1-LR era ligeramente menos fuerte que la de 0,3 mg/kg de SS1P. Los tumores en los ratones tratados con 6,0 mg/kg de SS1-LR alcanzaron un tamaño mínimo promedio de 92 mm³ los días 7 y 9, y todos reanudaron un crecimiento rápido el día 18. La dosis de 15 mg/kg de SS1-LR demostró una actividad antitumoral significativamente mejor que la de 0,3 mg/kg de SS1P. Los tumores en los ratones tratados con 15 mg/kg de SS1-LR retrocedieron a un tamaño mínimo promedio de 17 mm³ el día 22, cuatro de los seis tumores habían reanudado su crecimiento, un tumor permaneció invariable a 10 mm³ desde el día 18 y un tumor fue indetectable después del día 15. Sin embargo, en este modelo SS1-LR era aproximadamente 20 veces menos activa que SS1P, su baja toxicidad inespecífica nos permite tratar a los ratones con altas dosis y conseguir un efecto antitumoral superior.

Procesamiento de ITR internalizadas

Las diferencias en el tránsito intracelular y en el procesamiento entre SS1P y SS1-LR podrían representar la variación en cuanto a la actividad observada entre las dos ITR. Para analizar esta hipótesis, se examinó la internalización y el procesamiento de SS1P y SS1-LR en células A431/K5 por transferencia de Western (Fig 4). Se seleccionaron células A431/K5 porque expresaban altos niveles de mesotelina (aproximadamente 106 sitios/célula) e internalizaban grandes cantidades de ITR para su visualización. Se realizó una transferencia Western SDS-PAGE no reductora en lisados celulares completos de células A431/K5 tratadas con una incubación continua de 1 μ g/ml de SS1P o SS1-LR durante diversos intervalos de tiempo. La Figura 4A muestra un ciclo de tratamiento con SS1P, mientras que la Figura 4B muestra un ciclo de tiempo de tratamiento con SS1-LR.

Como se esperaba, las células A431/K5 tratadas con SS1P o SS1-LR, tenían bandas prominentes en posiciones

indicativas de las formas de longitud completa (62 kDa y 50 kDa, respectivamente) y reducida (51 kDa y 39 kDa, respectivamente) de las dos ITR. Ambas ITR contenían tres enlaces disulfuro en la región Fv: un enlace intracatenario en cada uno en los fragmentos V_H y V_L, y un enlace intercatenario entre los V_H y V_L (Fig 1). SS1P contenía un enlace disulfuro adicional en el dominio II entre los restos de cisteína que flanquean el sitio de escisión de furina (Cys²⁶⁵ y Cys²⁸⁷). El estado de oxidación del enlace disulfuro adicional en SS1P parece cambiar la migración de SS1P en la SDS-PAGE, causando el doblete observado (Fig 4A, reducida). Estas bandas se doblan en una sola banda cuando se tratan con un agente reductor (datos no mostrados).

También se esperaba observar bandas correspondientes a los fragmentos de escisión de furina C terminales de SS1P y SS1-LR (34 kDa y 24 kDa, respectivamente). Los lisados de células tratadas con SS1P mostraron una banda prominente cerca de 34 kDa, indicativa del fragmento de escisión de furina. En cambio, lisados de células tratadas con SS1-LR, mostraron solo una débil banda que correspondía a 24 kDa. La intensidad de cada banda se cuantificó con el programa informático ImageQuant (GE Healthcare). La Figura 4C muestra el porcentaje de intensidad de banda total del fragmento escindido con furina en cada momento. La SS1P escindida con furina alcanza un máximo de ligeramente más del 30 % de la suma de la intensidad de todas las bandas, mientras que SS1-LR alcanza un máximo de 6 % de la intensidad total. Hay una diferencia mayor de 5 veces entre las proporciones de SS1P escindida y SS1-LR escindida en cada momento, lo que sugiere que SS1-LR puede procesarse por furina de un modo menos eficaz que SS1P.

Mutantes enlazadores flexibles

Dado que nuestros datos sugieren que SS1-LR se procesa por furina de un modo menos eficaz que SS1P, se trató de potenciar la actividad de SS1-LR aumentando su eficiencia de escisión por furina. Se diseñaron varios mutantes para explorar si los cambios realizados en el sitio de escisión de furina podrían potenciar la actividad de SS1-LR mejorando la eficiencia de escisión por furina intracelular. Nuestra estrategia fue aumentar la flexibilidad del sitio de escisión de furina, y por tanto, su accesibilidad a furina, mediante la adición de enlazadores cortos no estructurados de Gly/Ser. SS1-LR/GGS (Fig 1B) incluye un enlazador de Gly-Gly-Ser en el extremo C terminal del resto 11 del sitio de escisión de furina y tiene actividad potenciada en ambas líneas celulares NCIH322M y KB31 (Fig 5). El aumento de la longitud del enlazador (SS1-LR/GGSx2; Fig 1B) no potencia la actividad adicional (datos no mostrados). La duplicación del sitio de escisión de furina con regiones enlazadoras adicionales (SS1-2xFurina Fig 1 B) tampoco potencia la actividad más allá de SS1-LR/GGS (datos no mostrados). A diferencia de SS1-LR, todos los mutantes enlazadores extendidos demuestran inhibición metabólica completa equivalente a la del control de ciclohexamida. Adicionalmente, para confirmar la importancia de la escisión por furina, se preparó el mutante SS1-LR/GGS R279G, que incluía la mutación R279G, que hace que la furina no pueda escindir el sitio. Este mutante era completamente inactivo contra células tanto NCI-H322M como KB31 (Fig 5), lo que demuestra la necesidad de la escisión de furina para la actividad.

Después se ensayó nuestra hipótesis de que el enlazador de GGS potenciaba la eficiencia de escisión de furina de SS1-LR. Sin embargo, un análisis de transferencia de Western de células A431/K5 tratadas con SS1-LR/GGS, no mostró mejoras en la proporción de ITR escindida con respecto al total (datos no mostrados). Del mismo modo, la escisión por furina *in vitro* de SS1-LR/GGS no mostró mejoras en la tasa de escisión por furina (datos no mostrados). Estos resultados indican que la citotoxicidad mejorada de SS1-LR/GGS no se debe a la escisión de furina potenciada, sino que es más bien el resultado de un mecanismo diferente. Otras posibles explicaciones incluyen la translocación potenciada de la toxina durante el tránsito intracelular.

Actividad en células de pacientes

Aunque este estudio siguió adelante, se diseñó una serie de 8 mutaciones puntuales en el dominio III para reducir la inmunogenicidad de PE en pacientes tratados con las ITR, eliminando epítomos de linfocitos B conocidos (Onda M y col., presentada para publicación en el PNAS.). Estas mutaciones (D406A, R432G, R467 A, R490A, R513A, E548S, Q592A y K590S) no influyen sobre la actividad de las ITR, sino que más bien reducen la inmunogenicidad de la proteína. Se incorporaron estas ocho mutaciones en SS1-LR/GGS, fabricando una nueva variante denominada SS1-LR/GGS/8M y su citotoxicidad se ensayó frente a células primarias extraídas de líquido pleural o ascitis de pacientes con mesotelioma. El líquido extraído de los pacientes contenía una mezcla de células, no todas malignas, y que no expresan uniformemente mesotelina. Por tanto, el ensayo proporciona una buena evaluación de la actividad relativa pero es solamente un cálculo estimado de la citotoxicidad absoluta. Las células se trataron en un pase previo con diversas concentraciones de SS1P o SS1-LR/GGS/8M y la viabilidad se evaluó después de cuatro días mediante un ensayo con violeta de cristal como se ha descrito. De las diversas células de pacientes que se evaluaron con respecto a su respuesta a SS1P, dos (NCI-M-02 y NCI-M-03) mostraron una buena respuesta al tratamiento (disminución de la viabilidad > 65 % al nivel de dosis de 100 ng/ml). La actividad de SS1P-LR/GGS/8M se evaluó en estas dos poblaciones y se comparó con la actividad de SS1P. Los datos se representan en la Figura 6 como valores fraccionados del valor de control no tratado.

Las dos células de pacientes NCI-M-02 y NCI-M-03 fueron sensibles al tratamiento con cualquiera de SS1P o SS1-LR/GGS/8M, mostrando una disminución mayor del 60 % en la viabilidad con respecto al control no tratado a dosis de 100 ng/ml o inferiores. NCI-M-02 y NCI-M-03 eran particularmente sensibles a SS1-LR/GGS/8M a los niveles de dosis de 1,0 y 10 ng/ml, lo que demostraba una citotoxicidad significativamente más alta cuando se comparó con

SS1P a estas concentraciones ($p < 0,05$). Como controles, las células de los pacientes también se trataron con las ITR BL22 y HB21 (datos no mostrados). BL22, que se dirige al marcador específico de linfocitos B CD22, no afectó a la viabilidad de ninguna de las poblaciones celulares a una dosis de 100 ng/ml. HB21, que se dirige al receptor ubicuo de transferrina y que se sabe que es extremadamente activa en casi todas las células, redujo la viabilidad de ambas líneas celulares casi un 90 % a una dosis de 10 ng/ml. En su conjunto, los datos muestran que SS1-LR/GGS/8M tenía una citotoxicidad similar a, o mayor que, SS1P en las dos poblaciones de células de pacientes diferentes. Se llega a la conclusión de que aunque las dos inmunotoxinas antimmesotelina no se comportan de la misma manera, tienen una actividad citotóxica comparable.

Ejemplo 2.

- Adicionalmente, se amplió un informe sobre la construcción, evaluación y contraste de SS1-LR/GGS/8M, una variante de SS1P con propiedades terapéuticas mejoradas. Como se ha indicado anteriormente, SS1-LR/GGS/8M incorpora mutaciones previamente mostradas que mejoran las ITR, así como una nueva mutación que potencia su actividad. La SS1-LR es una variante truncada de SS1P que contiene el fragmento catalítico de PE unido al Fv de SS1 mediante el resto 11 de PE del sitio de escisión de furina PE. La citotoxicidad de SS1-LR se evaluó en siete líneas celulares y se descubrió que era sustancialmente inferior que la de SS1P. Análisis adicionales de SS1-LR en células cultivadas indicaron que estaba mal procesada por furina durante la ruta de intoxicación. Para mejorar la escisión de furina se introdujo un enlazador de 3 restos en SS1-LR, creando SS1-LR/GGS. SS1-LR/GGS era significativamente más activo sobre las líneas celulares, pero no mostró escisión de furina potenciada. Se introdujeron ocho mutaciones puntuales en el fragmento catalítico de SS1-LR/GGS, que habían mostrado que disminuían la inmunogenicidad de la ITR eliminando epítomos de linfocitos B. Esta nueva ITR, SS1-LR/GGS/8M, mostró en este caso excelente actividad antitumoral, baja toxicidad inespecífica en roedores y reactividad reducida con suero anti SS1P humano. Adicionalmente, células primarias de pacientes con mesotelioma muestran respuestas potenciadas a SS1-LR/GGS/8M con respecto a SS1P. SS1-LR/GGS/8M es un candidato terapéutico superior para el desarrollo clínico debido a su baja antigenicidad, baja toxicidad inespecífica y alta actividad.
- En este estudio se utilizaron diversas líneas celulares procedentes de ser humano positivas a mesotelina. Estas células se obtuvieron y crecieron, en general, como se indica en el Ejemplo 1.

Ensayos de citotoxicidad

- La viabilidad de las líneas celulares tratadas con inmunotoxinas se midió utilizando el ensayo de recuento celular con el Kit-8 WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). Las células (2.000 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos, se dejaron adherirse durante una noche y se incubaron con diversas concentraciones de ITR durante 72 horas a un volumen final de 0,2 ml. Al final del periodo de incubación, se añadieron 10 μ l del reactivo CCK-8 a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C hasta que los pocillos con la máxima absorbancia a 450 nm alcanzaron valores de DO de ~ 1 . Los valores se normalizaron entre controles de ciclohexamida (10 μ g/ml) y tampón (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca ni Mg (D-PBS; Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD) que contenía seroalbúmina humana (HSA) al 0,2 %), después se ajustaron a una ecuación sigmoidea con pendientes variables para la meseta, línea basal y pendiente de Hill utilizando el programa informático GraphPad PRISM (programa informático GraphPad, Inc., La Jolla, CA). Posteriormente la ecuación se utilizó para interpolar la concentración de ITR cuya viabilidad celular se redujo al nivel del 50 % (CE_{50}).
- Las células de pacientes con mesotelioma se cultivaron y sus respuestas se evaluaron frente a SS1P y SS1-LR/GGS/8M básicamente como se describe (Xiang X, y col., PLoS One 2011; 6: e14640.). Se utilizó D-PBS y HB21 10 ng/ml (receptor de antitransferrina/PE40) como controles negativos y positivos para la muerte celular. Cada condición se evaluó por triplicado. Se realizaron análisis estadísticos de los datos resultantes mediante ANOVA utilizando el programa informático GraphPad Prism.

Ensayo antitumoral de xenoinjerto de ratón

- A veintiocho ratones lampiños hembra se les inyectó por vía subcutánea en el costado 5×10^6 células L55 en RPMI 0,2 ml con matrigel 4 mg/ml (BD Biosciences, San José, CA) el día 0. El volumen del tumor se midió regularmente con un calibrador durante los siguientes 30 días. Siete días después del implante (tumor promedio de ~ 100 mm³), los ratones se dividieron en cuatro grupos iguales y se les inyectó, por vía intravenosa, los días 7, 9 y 12, 0,2 ml de HSA al 0,2 % en D-PBS (vehículo) o vehículo que contenía SS1P (0,4 mg/kg) o SS1-LR/GGS/8M (0,4 o 2,5 mg/kg). Este experimento y todos los experimentos posteriores con animales se manipularon de acuerdo con las recomendaciones del National Institutes of Health aprobadas por el Animal Care and Use Committee of the National Cancer Institute.

Parámetros farmacocinéticos de suero de ratón

- A grupos de nueve ratones hembra Balb/c se les inyectó, por vía intravenosa, 10 μ g de SS1P o SS1-LR/GGS/8M en 0,2 ml de D-PBS con HSA al 0,2 %. Se extrajo sangre de grupos de tres ratones a intervalos de tiempo de 2 y 20, 5 y 30 o 10 y 60 minutos. Los sueros se analizaron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) como se ha descrito anteriormente (Bang S, y col., Clin Cancer Res 2005; 11:1545-50.25)).

Ensayo de filtración capilar en ratas

Para evaluar la toxicidad inespecífica de SS1-LR/GGS/8M, se utilizó un modelo de rata previamente descrito de síndrome de filtración capilar inducido por ITR (Siegall CB, y col., Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 9514-8.). En resumen, ratas hembra nu/nu (atímicas) Wistar Furthand Rowett de seis a ocho semanas de vida (Harlan-Sprague-Dawley) recibieron una inyección intravenosa de D-PBS, SS1P (0,2 o 0,3 mg/kg) o SS1-LR/GGS/8M (6 o 12 mg/kg). Después de 24 horas, las ratas se sacrificaron mediante exposición a CO₂. Se recogió fluido hidrotorácico de los animales sacrificados colocando el cuerpo posición recostada dorsal, retirando la pared torácica ventral y aspirando el fluido utilizando una jeringa de 3 ml y una aguja de calibre 27,5. Los pulmones de diversas ratas se extirparon, se fijaron durante 3 días en formalina al 10 %, se seccionaron y se tiñeron.

Se realizaron ensayos de internalización de ITR esencialmente como se ha descrito anteriormente, analizándose las muestras mediante transferencia de western no reductora utilizando un anticuerpo policlonal anti-PE38 de conejo.

Ensayo de antigenicidad.

La unión de SS1P o SS1-LR/GGS/8M a anticuerpos en los sueros de los pacientes se analizó esencialmente como se describe (Onda M, y col., Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 5742-7), excepto que para la detección de anticuerpos específicos de PE por ELISA, se utilizaron CD22-rFc y HA22.

Resultados**Actividad de SS1-LR *in vitro*.**

La inmunotoxina SS1P (Fig. 1) es el Fv de SS1 antimesotelina de dos cadenas estabilizado con disulfuro unido a PE38. Se introdujo la mutación LR (Weldon JE, y col. Blood 2009; 113: 3792-800); PE Δ251-273 y Δ285-394) en SS1P para crear SS1-LR y se evaluó su actividad en siete líneas celulares que expresaban mesotelina *in vitro*. La Tabla 2 resume datos de al menos 3 experimentos de citotoxicidad distintos como los valores CE₅₀ promedio y error típico de la media. En comparación con SS1P, SS1-LR era más activa en la línea celular HAY, pero menos activa en el resto de las líneas. La actividad de SS1-LR varió en gran medida entre las diferentes líneas celulares, pero era menos activa en las líneas de cáncer de ovario.

Tabla 2

Línea celular	Cáncer de origen	CE ₅₀ ± ETM (ng/ml)				
		SS1P	SS1-LR	SS1-LR/GGS	SS1-LR/GGS/8M	SS1-LR/GGS R279G
HAY	Mesotelioma	2,24 ± 0,21	0,52 ± 0,07	0,10 ± 0,04	0,22 ± 0,02	>1000
M30	Mesotelioma	0,57 ± 0,07	3,70 ± 0,85	0,93 ± 0,18	1,46 ± 0,20	>1000
NCI-H322M	Adenocarcinoma pulmonar	0,30 ± 0,07	1,65 ± 0,23	0,18 ± 0,05	0,42 ± 0,09	>1000
L55	Adenocarcinoma pulmonar	2,89 ± 0,43	6,67 ± 1,27	1,08 ± 0,17	1,73 ± 0,31	>1000
OVCAR-8	Carcinoma de ovario	0,84 ± 0,21	49,1 ± 37,9	2,84 ± 1,43	14,4 ± 8,78	>1000
A1847	Carcinoma de ovario	1,01 ± 0,21	27,0 ± 8,70	2,73 ± 0,79	17,7 ± 7,13	>1000
A431/K5	Carcinoma epidermoide	0,044 ± 0,005	0,561 ± 0,198	0,199 ± 0,033	0,194 ± 0,038	15,12 ± 3,625

SS1-LR/GGS/8M

La inmunogenicidad sigue siendo un problema significativo para las ITR basadas en PE (Weldon JE, y col., FEBS J. 2011 Dec; 278(23): 4683-700). Aunque trabajos que comparan HA22-LR con HA22 (Hansen JK, y col., J Immunother 2010; 33: 297-304)) nos conducen a anticipar que SS1-LR será menos inmunogénica que SS1P, los elementos restantes de PE sin embargo no suscitarán rápidamente anticuerpos neutralizantes. Para retirar epítomos de linfocitos B inmunogénicos en PE, se diseñó una serie de ocho mutaciones puntuales en el dominio III recientemente (Onda M, y col., Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 5742-7.). Estas mutaciones (D406A, R432G, R467A, R490A, R513A, E548S, Q592A y K590S) reducen drásticamente la inmunogenicidad de HA22-LR en ratones, pero no disminuyen enormemente su citotoxicidad. Se incorporaron las mutaciones en SS1-LR/GGS,

creando una nueva variante denominada SS1-LR/GGS/8M y se ensayó la ITR contra siete líneas celulares que expresaban mesotelina. Los valores de CE_{50} de estos experimentos se indican en la Tabla 2. SS1-LR/GGS/8M es más activa que SS1-LR y ocasionalmente más activa que SS1P (HAY, L55) pero es menos activa que SS1-LR/GGS. La disminución en la actividad es especialmente evidente en las líneas de cáncer de ovario.

5 Toxicidad inespecífica

En trabajos previos con la ITR anti-CD22, HA22, se descubrió que una sola dosis intravenosa de HA22 de 2 mg/kg era letal para los ratones, mientras que una dosis de HA22-LR de 20 mg/kg, no mostró toxicidad (Weldon JE, y col., Blood 2009; 113: 3792-800). Desde entonces se han administrado dosis únicas de HA22-LR de hasta 45 mg/kg a ratones sin causar la muerte (observaciones no publicadas, datos no mostrados) y se prevé un comportamiento similar de SS1-LR y sus variantes. Experimentos anteriores colocaron la DL_{50} intravenosa de una sola dosis de SS1P a 1,0 mg/kg en ratones Balb/C (Filpula D, y col., Bioconjug Chem 2007; 18: 773-84) y 0,75 mg/kg en ratones Swiss NIH (Onda M., y col., Cancer Res 2001; 61: 5070-7). Utilizando un programa de dosificación CDDx3 (administrado tres veces cada dos días) similar al programa clínico, los ratones habían tolerado una dosis máxima de SS1P de 0,4 mg/kg (observaciones no publicadas, datos no mostrados), pero a los ratones a los que administró SS1-LR habían recibido dosis de hasta 15 mg/kg CDDx3 sin toxicidad (datos no mostrados).

Aunque la toxicidad inespecífica disminuida de las ITR basadas en LR en ratones es desconcertante, puede que no sea relevante para las toxicidades principales observadas en ensayos clínicos. La toxicidad inespecífica de ITR en ratones es el resultado de daño hepático (Weldon JE, y col., Blood 2009; 113: 3792-800; Onda M, y col., J Immunol. 2000; 165: 7150-6), que no se observa comúnmente en pacientes. Un modelo de animal de toxicidad inespecífica más relevante es el síndrome de filtración capilar inducido por ITR en ratas (Siegall CB, y col., Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 9514-8., Siegall CB, y col., Clin Cancer Res 1997; 3: 339-45). El síndrome de filtración capilar, en el que se filtra líquido desde los vasos sanguíneos al espacio intersticial, es una toxicidad común observada en ensayos clínicos de las ITR basadas en PE. Utilizando este modelo, se observó que las ratas tratadas por vía intravenosa con SS1P 2 mg/kg parecían enfermas después de 24 horas; las costaba respirar y acumulaban fluido en la cavidad torácica (Fig. 7A). El aumento de la dosis de SS1P a 3 mg/kg incrementó el volumen de fluido torácico. En cambio, las ratas tratadas con D-PBS o SS1-LR/GGS/8M no mostraron síntomas de enfermedad y no retuvieron fluido. Se administraron dosis de 6 mg/kg y de 12 mg/kg de SS1-LR/GGS/8M sin efecto observable. Cuando los pulmones de las ratas tratadas con D-PBS, SS1P y SS1-LR/GGS/8M se fijaron y tiñeron, las tratadas con D-PBS o SS1-LR/GGS/8M parecieron normales, mientras que las ratas tratadas con SS1P mostraron síntomas de lesión grave (Fig. 7B). Aunque la molécula no basada en LR se había ensayado clínicamente, esta observación refuerza la propuesta de que las ITR basadas en LR pueden tener una toxicidad disminuida en pacientes.

Actividad de SS1-LR/GGS/8M *in vivo*

A continuación se evaluó la eficacia de SS1-LR/GGS/8M *in vivo* con un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón utilizando la línea celular de cáncer de pulmón L55. Se trataron grupos de siete ratones lampiños con tumores que tenían un promedio de $\sim 100 \text{ mm}^3$ por vía intravenosa los días 7, 9 y 12 con SS1-LR/GGS/8M a dosis de 0,4 y 2,5 mg/kg. Para comparar, se trataron grupos adicionales por vía intravenosa con el mismo régimen con vehículo (HSA al 0,2 % en D-PBS) o con SS1P 0,4 mg/kg, la dosis máxima tolerada de SS1P con este régimen de dosificación. El tamaño del tumor de cada ratón se midió regularmente durante 30 días después de la implantación (Fig. 7C).

Los tumores de los ratones tratados con vehículo crecieron hasta un tamaño promedio de aproximadamente 500 mm^3 el día 16 después de la implantación. Los ratones tratados con SS1P 0,4 mg/kg mostraron un breve retraso en el crecimiento tumoral que requirió hasta el día 23 después de la implantación para que los tumores alcanzaran un tamaño de aproximadamente 500 mm^3 . Se observó casi la misma respuesta en los ratones tratados con SS1-LR/GGS/8M 0,4 mg/kg, lo que sugería una igualdad entre SS1P y SS1-LR/GGS/8M en este modelo. Aunque SS1P no puede administrarse a ratones en este régimen a dosis mayores de 0,4 mg/kg debido a su toxicidad inespecífica, SS1-LR/GGS/8M puede darse a los ratones a dosis mucho más altas sin efecto de enfermedad. Se ensayó una dosis ~ 6 veces mayor de SS1-LR/GGS/8M (2,5 mg/kg) en este modelo de tumor. Se observó una regresión tumoral significativa ($p < 0,01$ utilizando un ensayo de *t* bilateral, emparejado) en este grupo de ratones, cuyos tumores alcanzaron un tamaño mínimo de $\sim 73 \text{ mm}^3$ el día 9. Este grupo de ratones también experimentó inhibición de crecimiento tumoral potenciada, alcanzando aproximadamente un tamaño de 500 mm^3 el día 30 después de la implantación.

Aunque SS1-LR/GGS/8M tuvo actividad equivalente a SS1P en el modelo de tumor de xenoinjerto de ratón con la línea celular L55, demostró actividad potenciada con respecto a SS1P en células L55 *in vitro*. Esta discrepancia en la actividad puede explicarse por una diferencia en la semivida en suero del ratón entre las dos moléculas. Trabajos previos que comparaban la semivida de HA22-LR ($\sim 51 \text{ kDa}$) con la de HA22 ($\sim 63 \text{ kDa}$) en ratones (Weldon JE, y col., Blood 2009; 113: 3792-800) mostraron que HA22-LR tenía una semivida casi 2 veces más corta que la de HA22 (de 7,8 y 14,6 minutos, respectivamente). Se postuló que esta diferencia se debía a una filtración renal incrementada de la molécula más pequeña, y se esperó encontrar un resultado similar cuando se comparaba SS1-LR/GGS/8M ($\sim 50 \text{ kDa}$) con SS1P ($\sim 63 \text{ kDa}$). Un análisis de muestras de suero extraídas de ratones inyectados con SS1-LR/GGS/8M mostró una semivida de 13 minutos en comparación con una semivida de 19 minutos para SS1P (Fig.

7D). Se llegó a la conclusión de que la diferencia en la semivida entre SS1-LR/GGS/8M y SS1P representa la discrepancia en la actividad relativa entre las dos moléculas *in vitro* e *in vivo*.

Antigenicidad de SS1-LR/GGS/8M

5 Basándose en estudios previos con la ITR HA22 (Onda M, y col., Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 5742-7), se esperaba que las mutaciones en SS1-LR/GGS/8M podrían retirar epítomos de linfocitos B de SS1P. Para evaluar esta propuesta, se comparó la reactividad de SS1P y de SS1-LR/GGS/8M con suero de cinco pacientes que habían desarrollado anticuerpos neutralizantes en respuesta al tratamiento con SS1P. El suero de los pacientes se mezcló inicialmente con SS1P o SS1-LR/GGS/8M. Posteriormente, los anticuerpos específicos de PE38 no unidos en el suero se detectaron utilizando un ELISA con ICQ (inmunocitoquímica) (Onda M, y col., Proc Natl Acad Sci USA 10 2011; 108: 5742-7). A partir de estos datos, se determinaron las concentraciones de SS1P y de SS1-LR/GGS/8M en las que la señal ELISA se redujo al 50 % (CI_{50}). Como previamente se ha indicado (Onda M, y col., J Immunol 2006; 177: 8822-34), los valores de CI_{50} se correlacionan con la afinidad de la interacción entre anticuerpo-antígeno. Los valores de CI_{50} de SS1P con respecto a SS1-LR/GGS/8M se representan gráficamente como porcentajes en la Figura 8. Para todos los sueros de los pacientes, las proporciones de los valores de CI_{50} de SS1P con respecto a 15 SS1-LR/GGS/8M estaban sustancialmente por debajo del 10 %, lo que indicaba que la fracción principal de anticuerpos reactivos a SS1P en los sueros no reaccionaba con SS1-LR/GGS/8M.

Actividad en células de pacientes

Para complementar nuestra evaluación de SS1-LR/GGS/8M en líneas celulares *in vitro* e *in vivo*, ensayamos su actividad contra células primarias obtenidas del fluido pleural o ascitis de pacientes con mesotelioma y mantenidas 20 en cultivo durante varios pases. Dado que el fluido extraído de los pacientes contenía una mezcla de células, el ensayo proporciona una buena evaluación de la actividad relativa pero es solo una estimación aproximada de la citotoxicidad absoluta. Las células de dos pacientes adicionales se trataron con diversas concentraciones de SS1P, y se evaluó su viabilidad después de cuatro días utilizando un ensayo con violeta de cristal. Las células de pacientes con mesotelioma de pase temprano NCI-M-16 y NCI-M-19 mostraron respuestas claras al tratamiento con SS1P 25 (disminución > 75 % en la viabilidad al nivel de dosis de 100 ng/ml). Se evaluó la actividad de SS1P-LR/GGS/8M en estas dos poblaciones de células procedentes de dos pacientes adicionales. Los datos se representan en la Figura 9 como valores fraccionarios normalizados entre los tratamientos de control de D-PBS (100 % viables) y 10 ng/ml del receptor antitransferrina/ITR PE40 HB21 (0 % viables). Todas las poblaciones de células del paciente eran extremadamente sensibles al tratamiento con SS1P-LR/GGS/8M, lo que demostraba una citotoxicidad 30 significativamente potenciada sobre SS1P.

SS1P es una inmunotoxina recombinante antimesotelina basada en la exotoxina A de *Pseudomonas* que está actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento del mesotelioma, pero con la posibilidad de tratar diversos tumores sólidos que expresan mesotelina. En ensayos clínicos, SS1P ha logrado resultados modestos pero 35 alentadores. Sin embargo su eficacia, se ha visto limitada a toxicidades limitantes de dosis y por la rápida generación de anticuerpos neutralizantes en pacientes. En el presente documento se informa que SS1-LR/GGS/8M, una variante de SS1P con baja antigenicidad, tiene excelente actividad, y reduce notablemente la toxicidad inespecífica en roedores.

SS1-LR/GGS/8M es como una variante muy activa, menos tóxica y menos antigénica de la ITR SS1P antimesotelina basada en PE. Nuestra evaluación inicial de SS1-LR mostró una actividad muy variable, pero generalmente baja en 40 una selección de líneas celulares que expresaban mesotelina *in vitro* (Tablas 1 y 2). Al explorar las razones de su baja actividad con respecto a SS1P, se estudió la internalización y procesamiento de SS1-LR y se descubrió que la proporción de SS1-LR escindida por furina era mucho más baja que la de SS1P en células tratadas con las dos ITR. Esto sugiere que la disminución de la escisión de furina podría ser limitante de la actividad de SS1-LR, y se diseñaron y produjeron diversos mutantes para ensayar esta hipótesis. La adición de un enlazador de Gly-Gly-Ser 45 corto después del sitio de escisión de furina no potenció la escisión de furina, sino que potenció la actividad de SS1-LR en líneas celulares. Combinando SS1-LR con el enlazador de GGS y otras ocho mutaciones puntuales que han demostrado reducir la inmunogenicidad de PE, generamos nuestra molécula final, SS1-LR/GGS/8M. En comparación con SS1P, SS1-LR/GGS/8M demostró toxicidad inespecífica muy reducida en un modelo de filtración capilar en ratas, una citotoxicidad potenciada contra células de pacientes y una reactividad reducida con anticuerpos 50 en sueros de pacientes. Experimentos iniciales con SS1-LR demostraron citotoxicidad variable con respecto a SS1P en líneas celulares. Sin embargo, la tendencia primaria, fue hacia una molécula menos activa. SS1-LR era más activa en la línea HAY y menos activa en las otras seis líneas. Esta tendencia es notablemente diferente de la versión anti-CD22 de la molécula LR, HA22-LR, que demostró una toxicidad similar o potenciada en la mayoría de las líneas celulares y en las células de los pacientes (Weldon JE, y col., Blood 2009; 113: 3792-800). Esta 55 discrepancia sugiere que hay una diferencia intrínseca entre la ruta de intoxicación de PE dirigida a mesotelina en células epiteliales y de PE dirigida a CD22 en linfocitos B.

En cuanto a la actividad generalmente disminuida de SS1-LR con respecto a SS1P, una posible explicación de esta 60 disparidad es una diferencia en la ruta de intoxicación intracelular. La variante LR de PE38 contiene delecciones extensas en el dominio II y Ib de PE y estas delecciones podrían haber afectado negativamente en la capacidad de tránsito de PE al citosol. Nuestros experimentos para detectar la PE de longitud completa y procesada en lisados de

células A431/K5 tratadas con SS1P y SS1-LR mostraron una diferencia drástica en la cantidad de ITR procesada con furina. Se procesó una gran fracción de ITR total en células tratadas con SS1P, pero solo una pequeña fracción de ITR total se escindió en las células tratadas con SS1-LR. Este resultado sugiere que la escisión pobre de furina puede estar limitando la actividad de SS1-LR, y nos propusimos mejorar esta etapa de la ruta de intoxicación por PE.

Añadiendo un enlazador flexible al sitio de furina SS1-LR, se produjo una ITR más activa, pero no se pudo demostrar una escisión de furina potenciada. La adición de un enlazador de Gly-Gly-Ser corto (SS1-LR/GGS, Fig. 1), de un enlazador más largo (SS1-LR/GGSx2, Fig. 1) o de una repetición del sitio de furina flanqueado por enlazadores de Gly-Gly-Ser cortos (SS1-LR/2x Furina, Fig. 1) concedió un aumento moderado de la citotoxicidad. Sin embargo, ninguna de estas moléculas potenció la proporción de SS1-LR escindida con furina en células A431/K5 tratadas o aumentó la velocidad de escisión de furina *in vitro* (datos no mostrados). Se llegó a la conclusión de que la adición de un enlazador debe potenciar la citotoxicidad a través de otro mecanismo, quizá relacionado con el tránsito intracelular o con una estabilidad de la toxina potenciada, y seguimos explorando estas posibilidades. Nuestros experimentos también demostraron la necesidad de escisión de furina en la citotoxicidad de SS1P. Una mutación puntual en SS1-LR/GGS que cambió una arginina esencial para la escisión a glicina (SS1-LR/GGS R279G, Fig. 1) produjo una proteína que no era escindible por furina. Esta ITR mostró una actividad extremadamente pobre en todas las células, con actividad despreciable a concentraciones de 120 µg/ml en seis de las siete líneas celulares ensayadas. El mutante no escindible muestra una CE50 por debajo de 1 µg/ml solo en células A431/K5 (Tabla 2), pero sin embargo su actividad se vio gravemente afectada. Además, la expresión artificialmente alta de mesotelina en esta línea celular puede no ser representativa de las líneas que expresan de manera natural mesotelina. La necesidad de escisión de furina en la ruta de intoxicación por PE ha sido cuestionada recientemente (Morlon-Guyot J, y col., Infect Immun 2009; 77: 3090-9) pero existen muchas pruebas de que la furina desempeña un papel importante durante la intoxicación (Ornatowski W, y col.; J Clin Invest 2007; 117: 3489-97; Shiryayev SA, y col., J Biol Chem 2007; 282: 20847-53; Sarac MS, y col., Infect Immun 2002; 70: 7136-9; Chiron MF, y col., J Biol Chem 1997; 272: 31707-11; Gu M, y col., Infect Immun 1996; 64: 524-7; Inocencio NM, y col., J Biol Chem 1994; 269: 31831-5 y Moehring JM, y col., J Biol Chem 1993; 18: 2590-4). En el caso presentado en este documento, la intoxicación de PE generalmente falla sin un sitio adecuado para el procesamiento de furina.

Nuestro laboratorio ha producido recientemente una ITR, HA22-LR-8M, que tiene una inmunogenicidad extremadamente baja debido a la eliminación de epítopos de linfocitos B (Onda M, y col., Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 5742-7). HA22-LR-8M contiene las deleciones de la variante LR de PE y otras 8 mutaciones puntuales en el dominio III. Estas mutaciones se colocaron en SS1P, generando SS1-LR/GGS/8M. Dado que la mayor parte de la respuesta inmunitaria contra las ITR está dirigida a PE, se espera que SS1-LR/GGS/8M presente una inmunogenicidad similarmente reducida. Para confirmar que SS1-LR/GGS/8M efectivamente retira los epítopos de linfocitos B humanos de SS1P, se examinó la reactividad de SS1-LR/GGS/8M con sueros de pacientes que desarrollaron anticuerpos neutralizantes durante el tratamiento con SS1P. En los cinco casos ensayados, SS1-LR/GGS/8M mostró antigenicidad drásticamente reducida en comparación con SS1P. Este resultado coincide con las observaciones de HA22 y HA22-LR/8M (Onda M, y col., Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 5742-7) e indican que se han identificado y retirado muchos de los epítopos inmunogénicos en las ITR basadas en PE.

La citotoxicidad de SS1-LR/GGS/8M se evaluó en diversas líneas celulares, en un modelo de tumor de ratón, y en células primarias de pacientes con mesotelioma. SS1-LR/GGS/8M demostró una excelente citotoxicidad con respecto a SS1P en las líneas celulares de cáncer de pulmón y mesotelioma, pero era poco activa en las líneas de cáncer de ovario. Este resultado es inesperado, dado que las líneas ováricas eran sensibles a SS1-LR/GGS, e indica que las ocho mutaciones puntuales en el dominio catalítico de PE pueden interferir con la actividad de SS1-LR/GGS/8M. En el modelo de tumor de ratón, tumores de xenoinjerto de L55 respondieron de manera similar a SS1-LR/GGS/8M y SS1P, aunque se podrían administrar dosis más altas de SS1-LR/GGS/8M para potenciar el efecto antitumoral. Finalmente, cuando se ensayó contra células neoplásicas primarias de pacientes con mesotelioma, SS1-LR/GGS/8M mostró citotoxicidad notablemente potenciada sobre SS1P. En general, nuestra evaluación de SS1-LR/GGS/8M mostró excelente actividad citotóxica.

Además de alta actividad y baja antigenicidad, SS1-LR/GGS/8M mostró una toxicidad inespecífica disminuida con respecto a SS1P. El modelo de rata para el síndrome de filtración capilar inducido por ITR demuestra de un modo eficaz esta diferencia. No hubo diferencias significativas entre las ratas tratadas con PBS y las tratadas con SS1-LR/GGS/8M, mientras que las ratas tratadas con SS1P desarrollaron acumulación de fluido debilitante en los pulmones. El síndrome de filtración capilar (también denominado síndrome de filtración vascular) se produce cuando el fluido se filtra desde los capilares, conduciendo a una caída de la albúmina en suero, retención de fluido, edema y aumento de peso. Esta toxicidad se ha observado frecuentemente en pacientes tratados con una variedad de inmunotoxinas, incluyendo las basadas en PE, y presumiblemente se produce a partir de daño celular endotelial colateral. La limitación de la toxicidad no dirigida de las ITR puede potenciar posiblemente su eficacia al permitir administrar dosis más altas de una manera segura. Este experimento, junto con los otros descritos en el presente documento, sugieren que SS1-LR/GGS/8M podría ser un excelente candidato para la clínica. La baja antigenicidad, baja toxicidad inespecífica y alta citotoxicidad de SS1-LR/GGS/8M son muy prometedoras para el futuro desarrollo de las ITR antimesotelina.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Pastan, Ira H.
Weldon, John
Hasan, Raffit
- <120> Inmunotoxina recombinante que se dirige a mesotelina
- <130> 77867-803685
- <140> US aún no asignado
- <141> Aún no asignado
- <160> 73
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- <211> 613
- <212> PRT
- <213> *Pseudomonas aeruginosa*
- <220>
- <223> Exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) natural
- <400> 1

Ala	Glu	Glu	Ala	Phe	Asp	Leu	Trp	Asn	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Cys	Val
1				5					10					15	
Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Ser	Ser	Arg	Met	Ser	Val	Asp	Pro
			20					25					30		
Ala	Ile	Ala	Asp	Thr	Asn	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	His	Tyr	Ser	Met	Val
		35				40						45			
Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu
	50					55					60				
Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Ile	Arg	Leu	Glu	Gly	Gly	Val	Glu
65					70					75					80
Pro	Asn	Lys	Pro	Val	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Arg	Gln	Ala	Arg	Gly	Ser
				85					90					95	
Trp	Ser	Leu	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	His	Glu	Lys	Pro	Ser	Asn
			100					105					110		
Ile	Lys	Val	Phe	Ile	His	Glu	Leu	Asn	Ala	Gly	Asn	Gln	Leu	Ser	His
		115				120						125			
Met	Ser	Pro	Ile	Tyr	Thr	Ile	Glu	Met	Gly	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Lys
	130					135					140				
Leu	Ala	Arg	Asp	Ala	Thr	Phe	Phe	Val	Arg	Ala	His	Glu	Ser	Asn	Glu
145					150					155					160
Met	Gln	Pro	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Val	Met
				165					170					175	
Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Trp	Ser	Glu	Trp	Ala	Ser
			180					185					190		
Gly	Lys	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Tyr	Asn	Tyr
		195					200					205			
Leu	Ala	Gln	Gln	Arg	Cys	Asn	Leu	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Gly	Lys	Ile
	210					215					220				
Tyr	Arg	Val	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Lys	His	Asp	Leu	Asp	Ile	Lys
225					230					235					240
Pro	Thr	Val	Ile	Ser	His	Arg	Leu	His	Phe	Pro	Glu	Gly	Gly	Ser	Leu
				245					250					255	
Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	His	Gln	Ala	Cys	His	Leu	Pro	Leu	Glu	Thr	Phe
			260					265					270		

Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
 275 280 285
 Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
 290 295 300
 Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
 325 330 335
 Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
 340 345 350
 Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
 370 375 380
 Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
 385 390 395 400
 Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
 405 410 415
 Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
 420 425 430
 Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
 435 440 445
 Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
 450 455 460
 Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 465 470 475 480
 Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
 485 490 495
 Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 500 505 510
 Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
 515 520 525
 Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
 530 535 540
 Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
 545 550 555 560
 Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
 565 570 575
 Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
 580 585 590
 Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 595 600 605
 Arg Glu Asp Leu Lys
 610

<210> 2
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Exotoxina A de *Pseudomonas* sintética con inmunogenicidad reducida

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(230)
 <223> Xaa = Gly, Ala o Ser

<400> 2

ES 2 641 877 T3

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Gly Asp Gly Gly Xaa Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln
 20 25 30

Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu
 35 40 45

Xaa Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
 50 55 60

Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp
 65 70 75 80

Ala Ile Trp Xaa Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr
 85 90 95

Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Xaa Gly Arg Ile Arg Asn
 100 105 110

Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe
 115 120 125

Tyr Xaa Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val
 130 135 140

Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
 145 150 155 160

Gly Pro Glu Glu Xaa Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
 165 170 175

Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
 180 185 190

Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Xaa Glu
 195 200 205

Xaa Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
 210 215 220

Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 225 230

<210> 3
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223>Exotoxina A de *Pseudomonas* modificada sintética PE-LR/GGS/8M

10

<400> 3

ES 2 641 877 T3

```

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser Pro Thr
1      5      10      15
Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val Ser Phe Ser Thr Arg
20      25      30
Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln
35      40      45
Leu Glu Glu Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
50      55      60
Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln
65      70      75      80
Asp Leu Asp Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala
85      90      95
Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala Gly Arg
100     105     110
Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
115     120     125
Pro Gly Phe Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala
130     135     140
Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp
145     150     155     160
Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu
165     170     175
Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro

180      185      190
Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
195      200      205
Asp Ser Glu Ala Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro
210      215      220
Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
225      230

```

- <210> 4
- <211> 238
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Exotoxina A de *Pseudomonas* modificada sintética PE-LR/FL/8X

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (12)...(14)
- <223> Xaa = Gly o Ser

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (15)...(19)
- <223> Xaa = Gly o Ser, pueden estar presentes o ausentes

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (20)...(230)
- <223> Xaa = Gly, Ala o Ser

- <400> 4

ES 2 641 877 T3

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Xaa Val
 20 25 30
 Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
 35 40 45
 Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Xaa Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
 50 55 60
 His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Xaa Gly Phe Tyr Ile
 85 90 95
 Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
 100 105 110
 Asp Ala Xaa Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
 115 120 125
 Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Xaa Thr Ser Leu Thr Leu Ala
 130 135 140
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
 145 150 155 160
 Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Xaa Gly Gly Arg
 165 170 175
 Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
 180 185 190
 Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Pro Asp Xaa Glu Xaa Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp
 210 215 220
 Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys

225

230

235

- 5 <210> 5
- <211> 238
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Exotoxina A de *Pseudomonas* modificada sintética PE-LR/FL/8M
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (12)...(14)
- <223> Xaa = Gly o Ser
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (15)...(19)
- <223> Xaa = Gly o Ser, pueden estar presentes o ausentes
- <400> 5

ES 2 641 877 T3

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val
 20 25 30
 Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
 35 40 45
 Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
 50 55 60
 His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile
 85 90 95
 Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
 100 105 110
 Asp Ala Ala Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
 115 120 125
 Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala
 130 135 140
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
 145 150 155 160
 Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg
 165 170 175
 Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
 180 185 190
 Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Pro Asp Ser Glu Ala Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp
 210 215 220
 Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 225 230 235

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera variable (VL) de SS1 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

10

<400> 6

Met Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 20 25 30
 Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

15

<210> 7
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 641 877 T3

<220>

<223> Cadena pesada variable (VH) de SS1 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

5 <400> 7

```

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly
 1          5          10          15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
 20          25          30
Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp
 35          40          45
Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys
 50          55          60
Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65          70          75          80
Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 85          90          95
Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100         105         110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys
 115          120
    
```

<210> 8

10 <211> 358

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cadena pesada variable (VH-PE) de SS1-LR/GGS/8M de la inmunotoxina recombinante del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 8

```

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly
 1          5          10          15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
 20          25          30
Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp
 35          40          45
Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys
 50          55          60
    
```

20

ES 2 641 877 T3

Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Arg His Arg
115 120 125
Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser Pro Thr Gly Ala Glu
130 135 140
Phe Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln
145 150 155 160
Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu
165 170 175
Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
180 185 190
Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp
195 200 205
Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr
210 215 220
Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala Gly Arg Ile Arg Asn
225 230 235 240
Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe
245 250 255
Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val
260 265 270
Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
275 280 285
Gly Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
290 295 300
Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
305 310 315 320
Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Ser Glu
325 330 335
Ala Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
340 345 350
Pro Arg Glu Asp Leu Lys
355

<210> 9
<211> 358
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cadena pesada variable (VH-PE) de SS1-LR/GGS/8X de la inmunotoxina recombinante del anticuerpo monoclonal antimetotetina sintético

<400> 9

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60
 Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Arg His Arg
 115 120 125
 Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser Pro Thr Gly Ala Glu
 130 135 140
 Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln
 145 150 155 160
 Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu
 165 170 175
 Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
 180 185 190
 Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp
 195 200 205
 Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr
 210 215 220
 Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe
 245 250 255
 Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val
 260 265 270
 Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
 275 280 285
 Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
 290 295 300
 Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
 305 310 315 320
 Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu
 325 330 335
 Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
 340 345 350
 Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 355

<210> 10
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera variable (V-L) de SS1 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

10

<400> 10

ES 2 641 877 T3

```

atggacatcg agctcactca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc 60
accatgacct gcagtgccag ctcaagtgta agttacatgc actggtacca gcagaagtca 120
ggcacctccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaac tggtctctgg agtcccagggt 180
cgcttcagtg gcagtgggtc tggaaactct tactctctca caatcagcag cgtggaggct 240
gaagatgatg caacttatta ctgccagcag tggccaagc accctctcac gttcggttgc 300
gggacaaagt tggaaataaa ataa 324

```

5 <210> 11
 <211> 1068
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada variable (VH-PE) de SS1-LR de la inmunotoxina recombinante del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 11

```

atgcaggtao aactgcagca gtctgggcct gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatactgca aggcactctgg ttactcattc actggctaca ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcatggaa agtgccctga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180
tacaaccaga agttcagggg caaggccaca ttaactgtag acaagtcato cagcacagcc 240
tacatggacc tcctcagtet gacatctgaa gactctgcag tctatctctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggagggggtt tgactactgg ggccaagggg ccacggtcac cgtctcctca 360
aaagcttccg gaggtcgtca ccgtcaacca cgcggttggg aacagctgcc aaccggtgcc 420
gagttcctgg gcgacggtgg cgatgtgtcc tttagacccc gtggtaccca gaactggacg 480
gtagagcggc tgctgcaggc acatcgtcag ctggaagagc gtggctatgt attcgttggc 540
taccacggca cttttctgga agcagctcag tccatcggtg ttggtgggtg ccgtgcccgt 600
tctcaagacc tggatgcgat ttggcgtggg ttctacattg caggcgatcc agcgtggca 660
tacggttatg cgcaggacca ggaaccggat gctcgcggtc gcattcgtaa tgggtgcgctg 720
ctgcgcgtat atgtgccgcg ttccagcctg ccgggcttct accgcactag cctgaccctg 780
gccgcgccgg aggcggcggg tgaagtggaa cgtctgattg gtcatoctct gcctctgcgc 840
ctggatgcca tcaccggccc agaggaggag ggcggtcgtc tggaaacat tctgggctgg 900
ccgctggctg aacgtacggt cgttattccg agcgcgatcc ctaccgatcc tcgtaacggt 960
ggcggcgatc tggaccatc ttctattcca gataaggagc aggcaatctc cgcgctgccg 1020
gattatgcaa gccaacgggg taaaccacct cgtgaagatc tgaataaa 1068

```

15 <210> 12
 <211> 1077
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cadena pesada variable (VH-PE) de SS1-LR/GGS/8M de la inmunotoxina recombinante del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

25 <400> 12

ES 2 641 877 T3

```

atgcaggtag aactgcagca gtctgggcct gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatacctgca aggcattctgg ttactcattc actggctaca ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcattggaa agtgccttga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180
tacaaccaga agttcagggg caaggccaca ttaactgtag acaagtcac cagcacagcc 240
tacatggacc tcctcagctc gacatctgaa gactctgcag tctatttctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggagggggtt tgactactgg ggccaagggg ccacggtcac cgtctcctca 360
aaagcttccg gaggtcgtca tcgccagccg cgcggctggg aacaactggg tggaggtccc 420
actggcgcgg agttcctcgg cgacggcggc gcagtcagct tcagcaccgc cggcacgcag 480
aactggacgg tggagcggct gctccagggc caccgccaac tggaggaggg cggctatgtg 540
ttcgtcggct accacggcac cttcctcga gggcgcaaa gcatcgtctt cggcgggggtg 600
cgcgcgcgca gccaggacct cgacgcgac tcggccgggt tctatatcgc cggcgatccg 660
gcgctggcct acggctacgc ccaggaccag gaaccgcag cagccggccg tatccgcaac 720
ggtgccctgc tgcgggteta tgtgcgcgc tcgagcctgc cgggcttcta cggcaccagc 780
ctgaccctgg ccgcgcggga ggccgggggc gaggtcgaac ggctgatcgg ccatccgctg 840
ccgctgcgcc tggacgccat caccggccc gaggagtcag gcgggcgcct ggagaccatt 900
ctcggctggc cgtgcccga ggcaccctg gtgattccct cggcgatccc caccgaccgc 960
cgcaacgtcg gcggcagacct cgaccctcc agcatcccc acagcgaagc agcgatcagc 1020
gcctgcggg actacgccag ccagcccggc aaaccgcgc gcgaggacct gaagtaa 1077

```

<210> 13

<211> 1068

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada variable (VH-PE) de SS1-LR/8M de la inmunotoxina recombinante del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 13

```

atgcaggtag aactgcagca gtctgggcct gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatacctgca aggcattctgg ttactcattc actggctaca ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcattggaa agtgccttga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180

```

```

tacaaccaga agttcagggg caaggccaca ttaactgtag acaagtcac cagcacagcc 240
tacatggacc tcctcagctc gacatctgaa gactctgcag tctatttctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggagggggtt tgactactgg ggccaagggg ccacggtcac cgtctcctca 360
aaagcttccg gaggtcgtca tcgccagccg cgcggctggg aacaactggc cactggcgcg 420
gagttcctcg gcgacggcgg cgcagtcagc ttcagcaccg gcggcacgca gaactggacg 480
gtggagcggc tgcctcaggg gcaccgccaa ctggaggagg gcggctatgt gttcgtcggc 540
taccacggca cttcctcga agcggcgcaa agcatcgtct tcggcggggg gcgcgcgcgc 600
agccaggacc tcgacgcgat ctgggcgggt ttctatatcg ccggcgatcc ggcgctggcc 660
tacggctacg cccaggacca ggaaccgcag gcagccggcc gtatccgcaa cggtgccctg 720
ctgcgggtct atgtgcgcgc ctcgagcctg cgggcttct acgcccaccag cctgaccctg 780
gccgcgcggg aggcggcggg cgaggtcga cggctgatcg gccatccgct gccgctgcgc 840
ctggacgcca tcaccggccc cgaggagtca ggccggcgc tggagacct tctcggctgg 900
ccgctggccg agcgcaccgt ggtgattccc tcggcgatcc ccaccgacc gcgcaacgtc 960
ggcggcgacc tcgaccctgc cagcatcccc gacagcgaag cagcgatcag cgcctgccc 1020
gactacgcca gccagcccgg caaacccgcg cgcgaggacc tgaagtaa 1068

```

<210> 14

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo Fv antimesotelina sintético (SS scFv)

<400> 14

ES 2 641 877 T3

Met	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Glu	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15	
Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly
			20					25					30		
Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ile	Gly	Leu	Ile	Thr	Pro	Tyr	Asn	Gly	Ala	Ser	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys
	50					55					60				
Phe	Arg	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala
65					70				75					80	
Tyr	Met	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe
			85						90					95	
Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100				105					110			
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		115				120						125			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala
	130					135					140				
Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala
145					150					155				160	
Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr
			165						170					175	
Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val
			180					185					190		
Pro	Gly	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr
		195				200						205			
Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Asp	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
	210					215					220				
Trp	Ser	Gly	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
225					230					235					240
Lys															

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Restos C terminales sintéticos de PE natural

10

<400> 15

Arg Glu Asp Leu Lys
 1 5

15

<210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Señal de retención canónica, sintética del retículo endoplasmático

<400> 16

Lys Asp Glu Leu
 1

25

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 641 877 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de furina (FCS) sintético

5

<400> 17

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10

10

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Enlazador flexible (FL) sintético

<400> 18

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

20

<210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Enlazador peptídico corto sintético

30

<400> 19

Ala Ser Gly Gly
1

35

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Enlazador peptídico corto sintético y sitio de escisión de furina para SS1-LR

<400> 20

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

45

<210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Enlazador peptídico corto sintético y sitio de escisión de furina para SS1-LR/GGS

<400> 21

55

ES 2 641 877 T3

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

5 <210> 22
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Enlazador peptídico corto sintético y sitio de escisión de furina para SS1-LR/GGSx2
 <400> 22

Ala Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
 1 5 10 15
 Glu Gln Leu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25

15 <210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Enlazador peptídico corto sintético y sitio de escisión de furina para SS1-LR/2xFurina
 <400> 23

Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Ser
 20 25 30

25 <210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Enlazador peptídico corto sintético y sitio de escisión de furina para SS1-LR/GGS R279G
 35 <400> 24

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

40 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido enlazador scFv sintético
 <400> 25

ES 2 641 877 T3

Gly Val Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

5 <210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Señal de retención del retículo endoplasmático de extremo carboxilo sintético
<400> 26

Arg Glu Asp Leu
1

15 <210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Restos terminales mutados sintéticos de PE
<400> 27

Arg Glu Glu Leu
1

30 <210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Restos terminales mutados sintéticos de PE
<400> 28

Arg Asp Glu Leu
1

40 <210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sustituido sintético
<400> 29

Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10

50 <210> 30
<211> 4
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

ES 2 641 877 T3

<220>
<223> Sitio de escisión de furina mínimo sintético

5 <400> 30

Arg Lys Lys Arg
1

10 <210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sitio de escisión de furina mínimo sintético

<400> 31

Arg Arg Arg Arg
1

20 <210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sitio de escisión de furina mínimo sintético

<400> 32

Arg Lys Ala Arg
1

30 <210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

40 <400> 33

Ser Arg Val Ala Arg Ser
1 5

45 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

<400> 34

Thr Ser Ser Arg Lys Arg Arg Phe Trp
1 5

55 <210> 35

ES 2 641 877 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

<400> 35

Ala Ser Arg Arg Lys Ala Arg Ser Trp
1 5

10 <210> 36
<211> 8
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

20 <400> 36

Arg Arg Val Lys Lys Arg Phe Trp
1 5

25 <210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Sitio de escisión de furina sintético

<400> 37

Arg Asn Val Val Arg Arg Asp Trp
1 5

35 <210> 38
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

45 <400> 38

Thr Arg Ala Val Arg Arg Arg Ser Trp

1 5

50 <210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Sitio de escisión de furina sintético

<400> 39

ES 2 641 877 T3

Arg Gln Pro Arg
1

5 <210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético
<400> 40

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
1 5

15 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético
<400> 41

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
1 5

25 <210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético
<400> 42

His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln
1 5

40 <210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético
<400> 43

Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
1 5

50 <210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

ES 2 641 877 T3

<400> 44

Arg Ser Lys Arg
1

5 <210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

<400> 45

15 Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

25 <400> 46

His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu
1 5

30 <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

<400> 47

Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5

40 <210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

<400> 48

50 His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10

55 <210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 641 877 T3

<220>
<223> Sitio de escisión de furina sintético

<400> 49

5

Arg His Arg Ser Lys Arg
1 5

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Enlazador peptídico scFv sintético

15

<400> 50

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Cadena pesada variable de CDR1 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

25

<400> 51

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

30

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cadena pesada variable de CDR2 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

40

<400> 52

Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15
Gly

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Cadena pesada variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

50

<400> 53

Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

55

ES 2 641 877 T3

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Cadena ligera variable de CDR1 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 54

10

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Cadena ligera variable de CDR2 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

20

<400> 55

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

25

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 56

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

35

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

45

<400> 57

Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
1 5

50

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 58

ES 2 641 877 T3

Gln Gln Trp Ser Gly His Pro Leu Thr
1 5

5 <210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético
<400> 59

Gln Gln Trp Ser Ala His Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

20 <223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético
<400> 60

Gln Gln Trp Ser Gln Ile Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético
<400> 61

35

Gln Gln Trp Gly Phe Asn Pro Leu Thr
1 5

40 <210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético
<400> 62

Gln Gln Trp Gly Thr Asn Pro Leu Thr
1 5

50 <210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 641 877 T3

<220>

<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 63

5

Gln Gln Trp Gly Ser His Pro Leu Thr
1 5

<210> 64

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

15

<400> 64

Gln Gln Trp Gly Asp Phe Pro Leu Thr
1 5

20

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 65

Gln Gln Trp Gly Asp His Pro Leu Thr
1 5

30

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

40

<400> 66

Gln Gln Trp Ser Ala His Pro Leu Thr
1 5

45

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Cadena ligera variable de CDR3 del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

<400> 67

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Thr Thr
1 5

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Enlazador sintético que une al extremo carboxilo del anticuerpo con el extremo N del sitio de escisión de furina

10 <400> 68

Ala Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
20 <220>
<223> Enlazador flexible sintético

<400> 69

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

25
30 <210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible sintético

35 <400> 70

Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 71
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Enlazador flexible (FL) sintético

45 <400> 71

Gly Ser Gly Gly
1

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50
55 <220>
<223> Enlazador flexible (FL) sintético

<400> 72

ES 2 641 877 T3

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

5 <210> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Enlazador flexible (FL) sintético

<400> 73

Gly Gly Ser Gly
1

15 <210> 74
<211> 355
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cadena pesada variable (VH-PE) de SS1-LR de la inmunotoxina recombinante del anticuerpo monoclonal antimesotelina sintético

25 <400> 74

ES 2 641 877 T3

Met	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Glu	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15	
Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly
			20					25					30		
Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ile	Gly	Leu	Ile	Thr	Pro	Tyr	Asn	Gly	Ala	Ser	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys
	50					55					60				
Phe	Arg	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala
65					70					75					80
Tyr	Met	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Arg	His	Arg
			115					120					125		
Gln	Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Leu	Pro	Thr	Gly	Ala	Glu	Phe	Leu	Gly
	130					135					140				
Asp	Gly	Gly	Asp	Val	Ser	Phe	Ser	Thr	Arg	Gly	Thr	Gln	Asn	Trp	Thr
145					150					155					160
Val	Glu	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	His	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Arg	Gly	Tyr
				165					170					175	
Val	Phe	Val	Gly	Tyr	His	Gly	Thr	Phe	Leu	Glu	Ala	Ala	Gln	Ser	Ile
			180					185					190		
Val	Phe	Gly	Gly	Val	Arg	Ala	Arg	Ser	Gln	Asp	Leu	Asp	Ala	Ile	Trp
		195					200					205			
Arg	Gly	Phe	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asp	Pro	Ala	Leu	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Ala
	210					215					220				
Gln	Asp	Gln	Glu	Pro	Asp	Ala	Arg	Gly	Arg	Ile	Arg	Asn	Gly	Ala	Leu
225					230					235					240
Leu	Arg	Val	Tyr	Val	Pro	Arg	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Tyr	Arg	Thr
				245					250					255	
Ser	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Glu	Val	Glu	Arg	Leu
			260					265					270		
Ile	Gly	His	Pro	Leu	Pro	Leu	Arg	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Gly	Pro	Glu
		275					280						285		
Glu	Glu	Gly	Gly	Arg	Leu	Glu	Thr	Ile	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu	Ala	Glu
	290					295					300				
Arg	Thr	Val	Val	Ile	Pro	Ser	Ala	Ile	Pro	Thr	Asp	Pro	Arg	Asn	Val
305					310					315					320
Gly	Gly	Asp	Leu	Asp	Pro	Ser	Ser	Ile	Pro	Asp	Lys	Glu	Gln	Ala	Ile
				325					330					335	
Ser	Ala	Leu	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gln	Pro	Gly	Lys	Pro	Pro	Arg	Glu
			340					345					350		
Asp	Leu	Lys													
		355													

REIVINDICACIONES

1. Una molécula quimérica dirigida a mesotelina, que comprende un polipéptido de fusión que tiene la fórmula M-L1-FCS-FL-dominio III funcional de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) **caracterizada porque** el enlazador flexible (FL) consiste en de 3 a 8 restos de aminoácidos continuos seleccionados independientemente entre glicina y serina, en la que
- 5
- (a) M es un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento del mismo que se une específicamente a mesotelina;
- (b) L1 consiste en de 1 a 10 restos de aminoácidos continuos;
- 10 (c) FCS es un sitio de escisión de furina que consiste en restos de aminoácidos continuos capaces de escindirse por furina;
- (d) el dominio III funcional de la PE consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 395 a la 613, que opcionalmente comprende
- (i) una sustitución de uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1,
- 15 (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de SEQ ID NO: 1,
- (iii) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 de SEQ ID NO: 1
- 20 (iv) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina o serina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 de SEQ ID NO: 1, o
- (v) una combinación de cualquiera de (i)-(iv).
2. Una molécula quimérica dirigida a mesotelina, que comprende un polipéptido de fusión que tiene la fórmula M-L1-FCS-FL-dominio III funcional de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) **caracterizada porque** el enlazador flexible (FL) consiste en de 3 a 8 restos de aminoácidos continuos seleccionados independientemente entre glicina y serina, en la que
- 25
- (a) M es un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento del mismo que se une específicamente a mesotelina;
- (b) L1 consiste en de 1 a 10 restos de aminoácidos continuos;
- 30 (c) FCS es un sitio de escisión de furina que consiste en restos de aminoácidos continuos capaces de escindirse por furina;
- (d) el dominio III funcional de la PE consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 395 a la 613, que opcionalmente comprende
- (i) una sustitución de uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1,
- 35 (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de SEQ ID NO: 1,
- (iii) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 de SEQ ID NO: 1
- 40 (iv) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de restos correspondientes a los restos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 de SEQ ID NO: 1, o
- (v) una combinación de cualquiera de (i)-(iv).
3. La molécula de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)'₂, una proteína Fv monocatenaria ("scFv") o un fragmento de proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv").
- 45
4. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el fragmento de anticuerpo comprende regiones variables de cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas estabilizadas con disulfuro, fusionadas al resto de la molécula a través de un enlace de la cadena pesada con L1.
5. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende:
- 50 (a) una cadena V_H que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de GYTMN (SEQ ID NO: 51), una secuencia de aminoácidos de CDR2 de LITPYNGASSYNQKFRG (SEQ ID NO: 52) y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de GGYDGRGFDY (SEQ ID NO: 53) y
- (b) una cadena V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de SASSSVSYMH (SEQ ID NO: 54), una secuencia de aminoácidos de CDR2 de DTSKLAS (SEQ ID NO: 55) y una secuencia de aminoácidos de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en QQWSGYPLT (SEQ ID NO: 56), QQWSKHPLT (SEQ ID NO: 57), QQWSGHPLT (SEQ ID NO: 58), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 59), QQWSQIPLT (SEQ ID NO: 60), QQWGFNPLT (SEQ ID NO: 61), QQWGTNPLT (SEQ ID NO: 62), QQWGSHPPLT (SEQ ID NO: 63), QQWGDPLT (SEQ ID NO: 64), QQWGDHPLT (SEQ ID NO: 65), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 66) y
- 55

QQWSGYPTT (SEQ ID NO: 67).

6. La molécula de la reivindicación 5, en la que la secuencia de aminoácidos de CDR3 de V_L es QQWSKHPLT (SEQ ID NO: 57).
7. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que L1 tiene una longitud de 3 a 5 aminoácidos.
- 5 8. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que L1 es ASGG (SEQ ID NO: 19).
9. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el dominio III de PE tiene una sustitución de alanina, glicina o serina de al menos un resto de aminoácido correspondiente a un resto de aminoácido de SEQ ID NO: 1 seleccionado del grupo que consiste en D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597.
- 10 10. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el dominio III de PE tiene una sustitución de alanina, glicina o serina de al menos un resto de aminoácido correspondiente a un resto de aminoácido de SEQ ID NO: 1 seleccionado del grupo que consiste en D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592.
11. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el FL es GGS, (GGS)₂ (SEQ ID NO: 18), GSGG (SEQ ID NO: 71), GSGG (SEQ ID NO: 72), GSG (SEQ ID NO: 73), GSG o GGG.
- 15 12. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el FL es GGS.
13. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la secuencia de escisión de furina es RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 17).
14. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el dominio III funcional de PE es el dominio III funcional de PE de LR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 desde la posición 20 a la 237, o de SEQ ID NO: 5 desde la posición 20 a la 237.
- 20 15. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera variable SS1 de SEQ ID NO: 6 y una cadena pesada variable SS1 de secuencia de SEQ ID NO: 7. estabilizadas por disulfuro.
16. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la molécula comprende la cadena ligera variable SS1 de SEQ ID NO: 6 y el polipéptido de fusión de cadena pesada variable SS1-PE de SEQ ID NO: 8 en la que las cadenas ligera y pesada variables forman un anticuerpo estabilizado por disulfuro.
- 25 17. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el FCS es idéntico en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 274 a la 284 o es la secuencia de aminoácidos RHRSKRGWEQL (SEQ ID NO: 29).
18. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 19. Un ácido nucleico que codifica la molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
20. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 19.
21. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 19.
22. La molécula quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para su uso en el tratamiento de un cáncer que sobreexpresa mesotelina en un sujeto que lo necesite, preferentemente en el que el cáncer es un adenocarcinoma de pulmón, un carcinoma de ovario, un mesotelioma y/o un carcinoma epidermoide.
- 35 23. Un polipéptido de fusión que tiene la fórmula FCS-FL-dominio III funcional de PE **caracterizado porque** el enlazador flexible (FL) consiste en de 3 a 8 restos de aminoácidos contiguos seleccionados independientemente entre glicina y serina, en el que:
- 40 (a) FCS consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 274 a la 284 o en la secuencia de aminoácidos RHRSKRGWEQL (SEQ ID NO: 29);
- (b) el dominio III funcional de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) consiste en los restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 395 a la 613, comprendiendo opcionalmente
- 45 (i) una sustitución de uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1,
- (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de SEQ ID NO: 1,
- (iii) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 de SEQ ID NO: 1
- 50 (iv) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina o serina en el lugar de uno o más restos

correspondientes a los restos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 de SEQ ID NO: 1, o (v) una combinación de cualquiera de (i)-(iv).

5 24. Un polipéptido de fusión que tiene la fórmula FCS-FL-dominio III funcional de PE **caracterizado porque** el enlazador flexible (FL) consiste en de 3 a 8 restos de aminoácidos continuos seleccionados independientemente entre glicina y serina, en el que:

(a) FCS consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 274 a la 284 o en la secuencia de aminoácidos RHRSKRGWEQL (SEQ ID NO: 29);

(b) el dominio III funcional de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) consiste en restos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a SEQ ID NO: 1 desde la posición 395 a la 613, comprendiendo opcionalmente

- 10 (i) una sustitución de uno o más restos correspondientes a 609-613 de SEQ ID NO: 1,
(ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de SEQ ID NO: 1,
(iii) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de uno o más restos correspondientes a los restos D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576
15 y L597 de SEQ ID NO: 1
(iv) una sustitución, independientemente, de alanina, glicina, serina o glutamina en el lugar de restos correspondientes a los restos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 de SEQ ID NO: 1, o
(v) una combinación de cualquiera de (i)-(iv).

20 25. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 23 o 24.

Figura 1

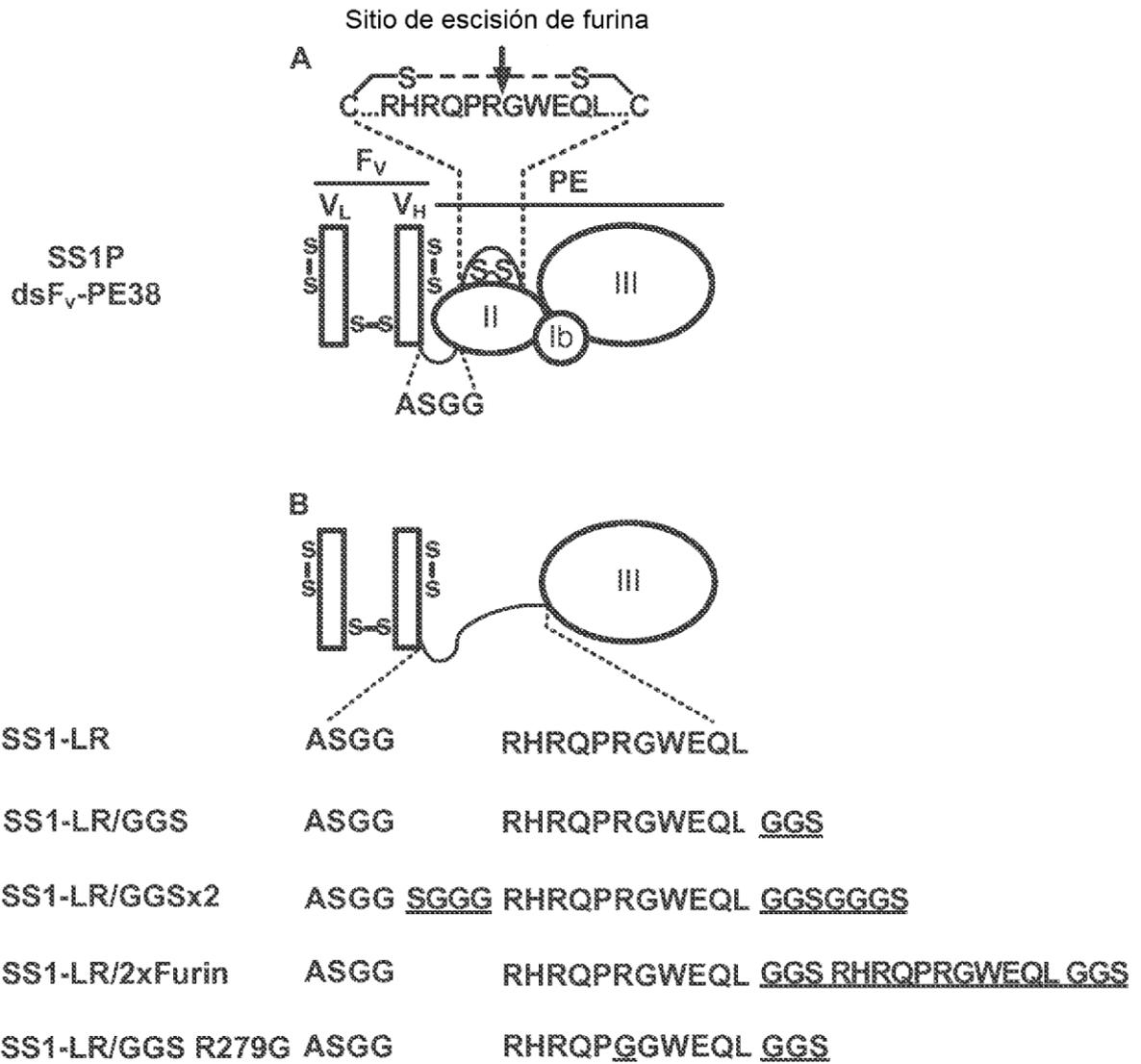
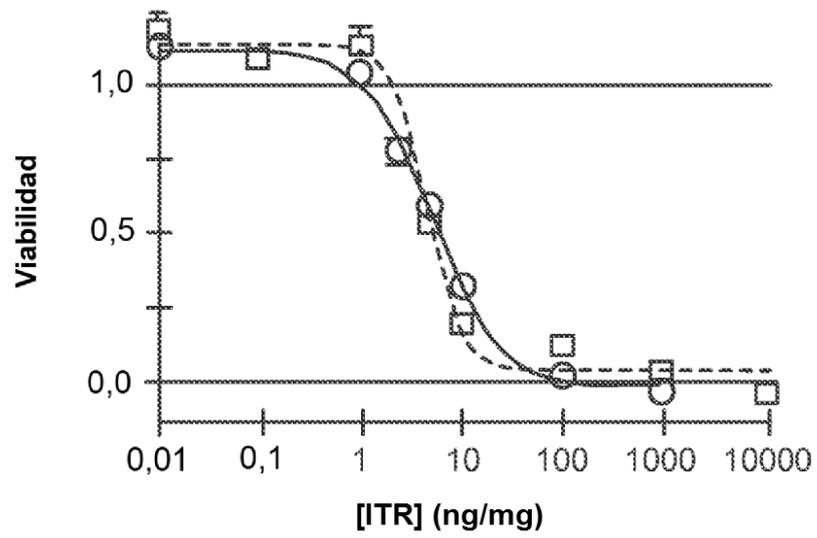


Figura 2

○ SS1P
□ SS1-LR

L55



NCI-H322M

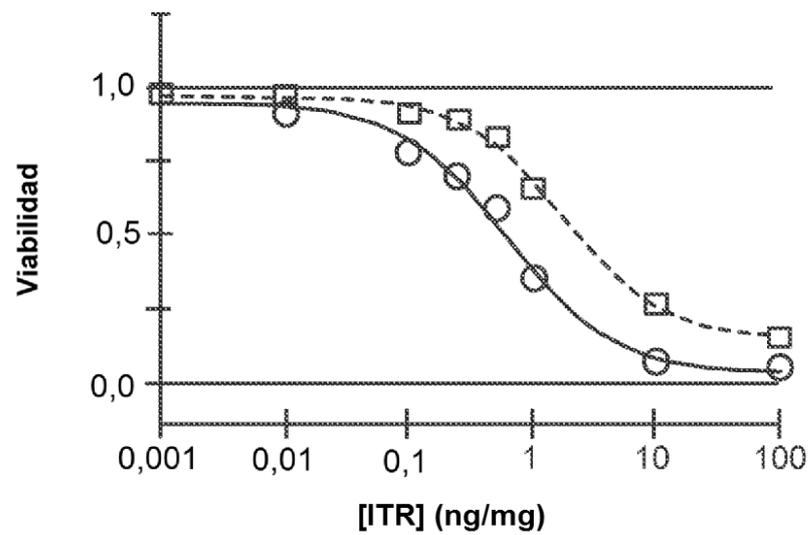
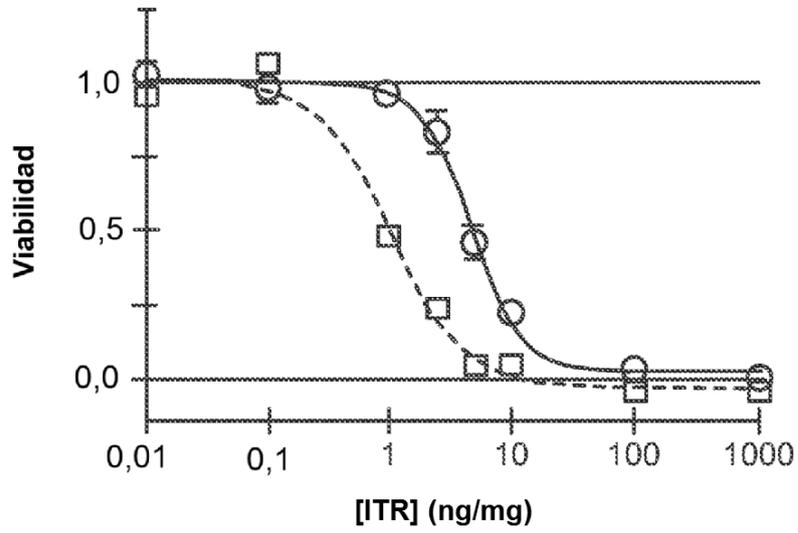


Figura 2 (continuación)

○ SS1P
□ SS1-LR

HAY



KB31

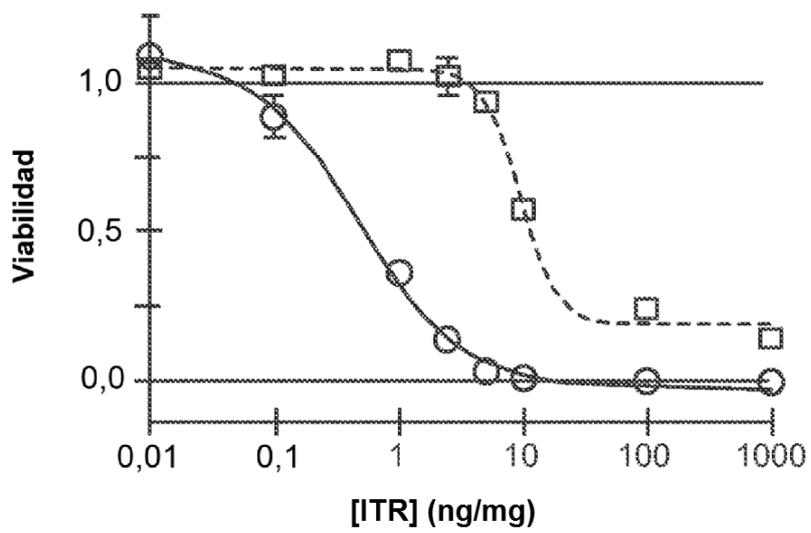
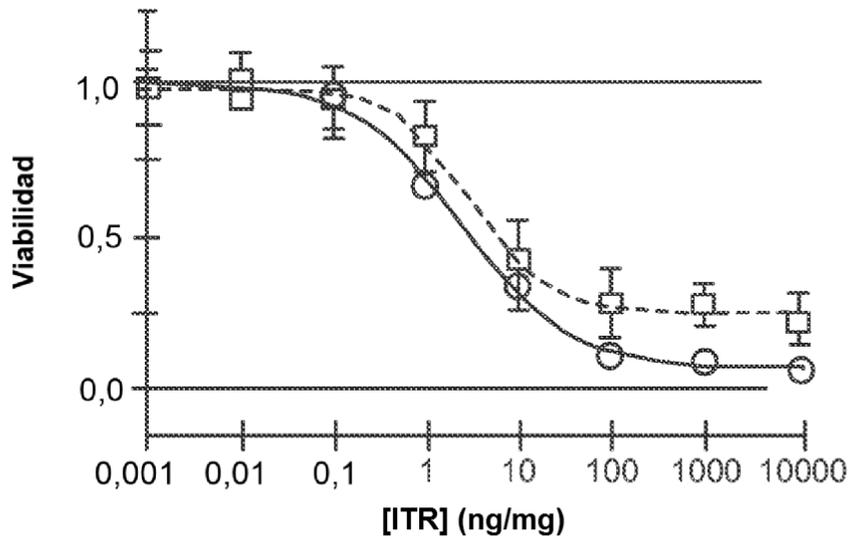


Figura 2 (continuación)

○ SS1P
□ SS1-LR

M30



A431/K5

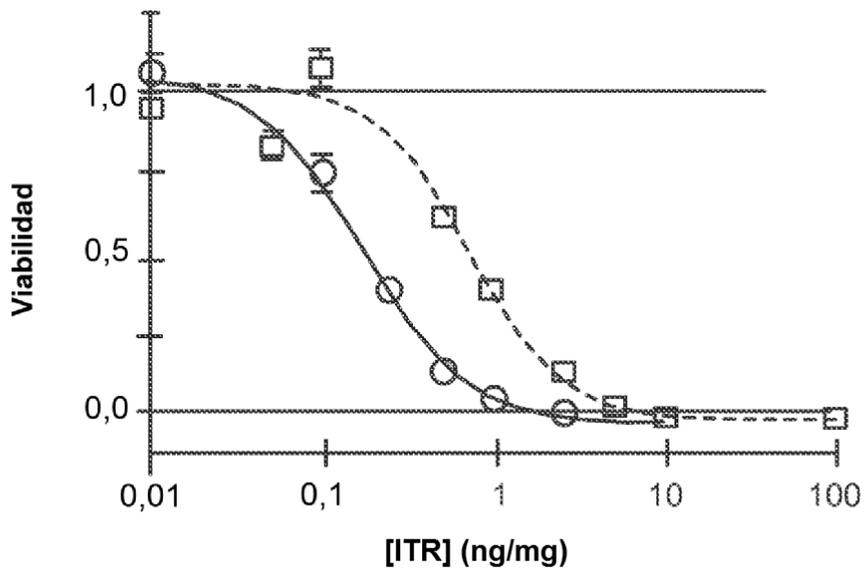
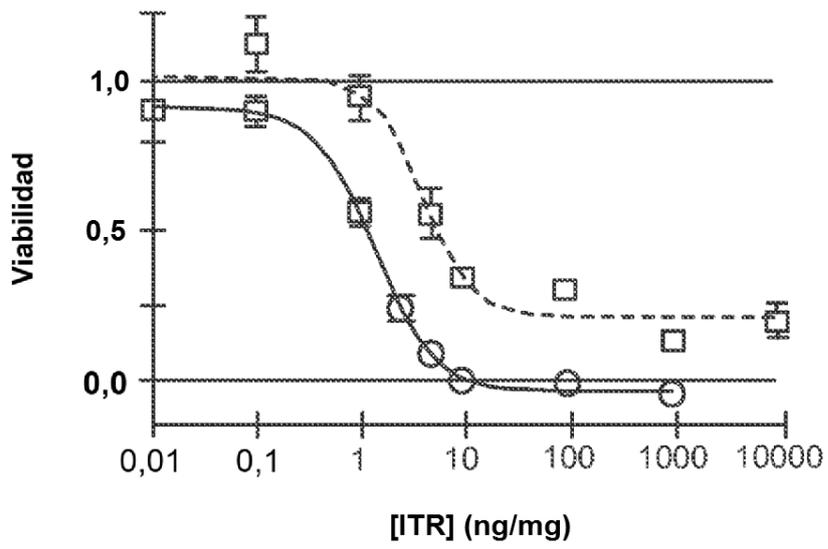


Figura 2 (continuación)

○ SS1P
□ SS1-LR

OVCAR-8



A1847

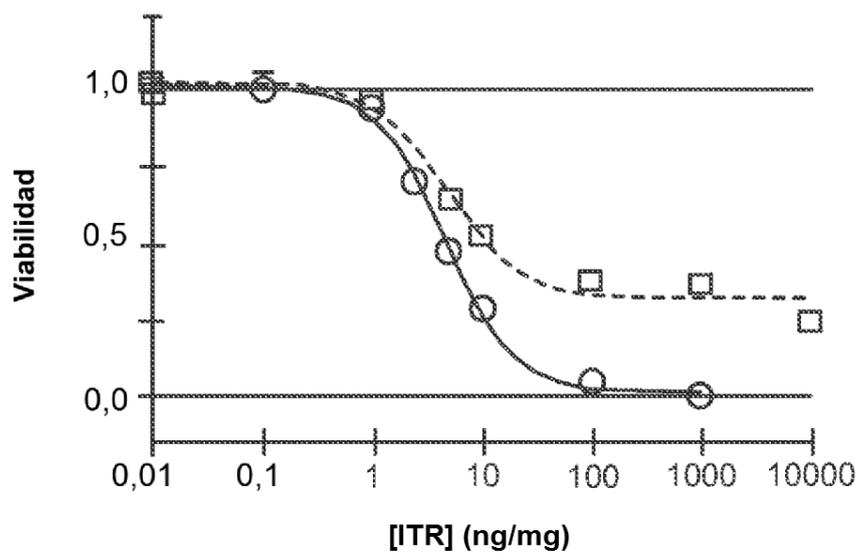


Figura 3

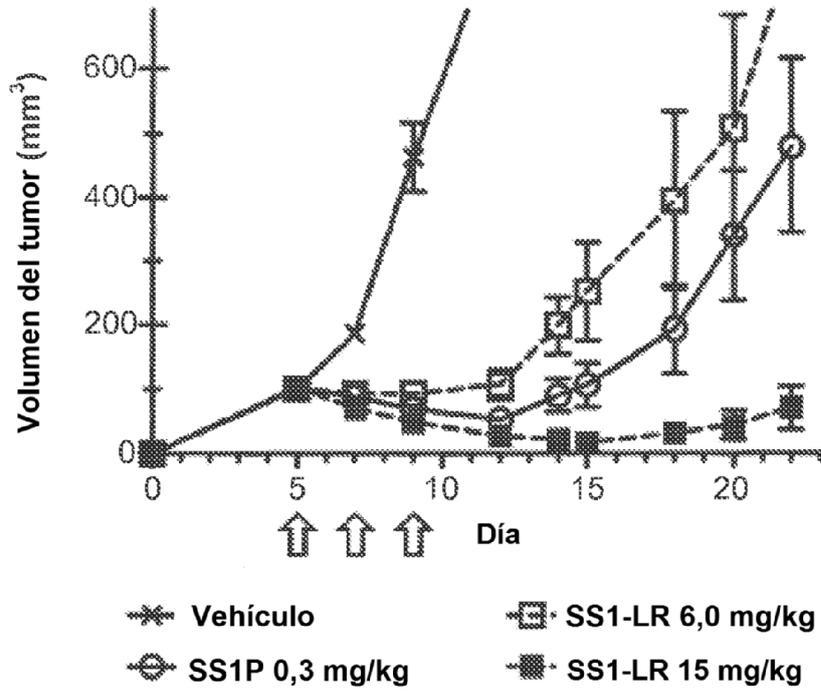


Figura 4

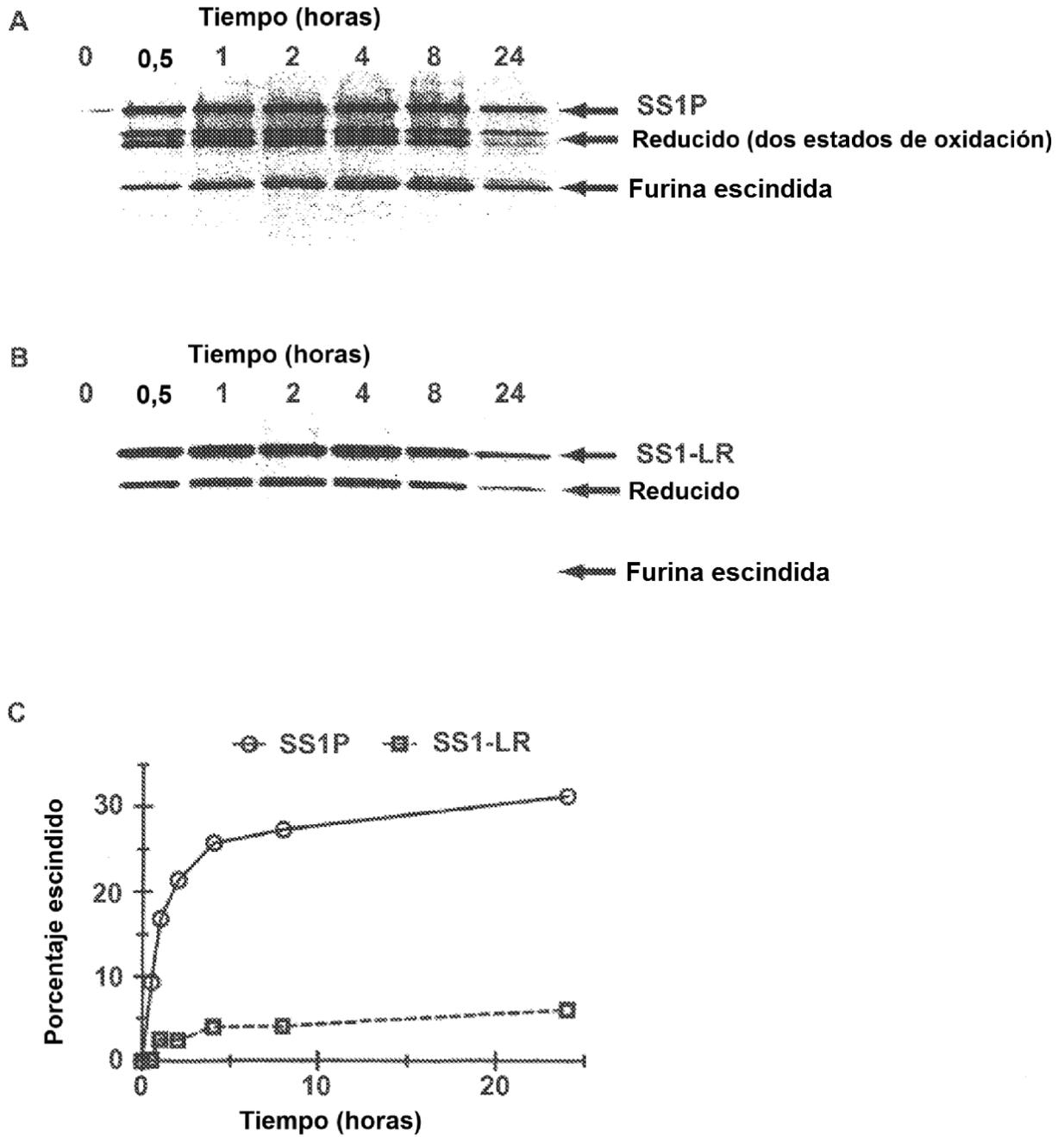
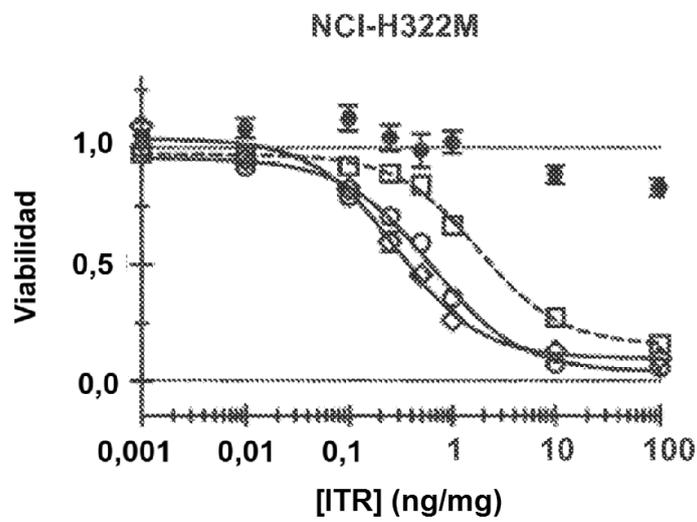
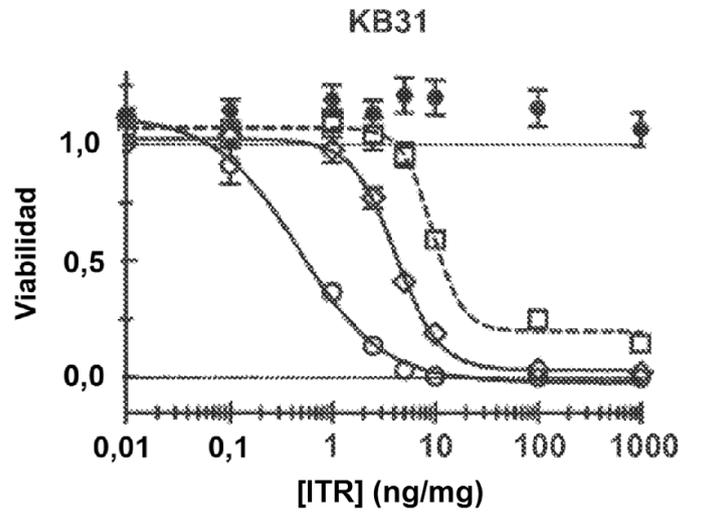


Figura 5



- | | |
|----------|--------------------|
| ○ SS1P | ◇ SS1-LR/GGS |
| □ SS1-LR | ● SS1-LR/GGS R279G |

Figura 6

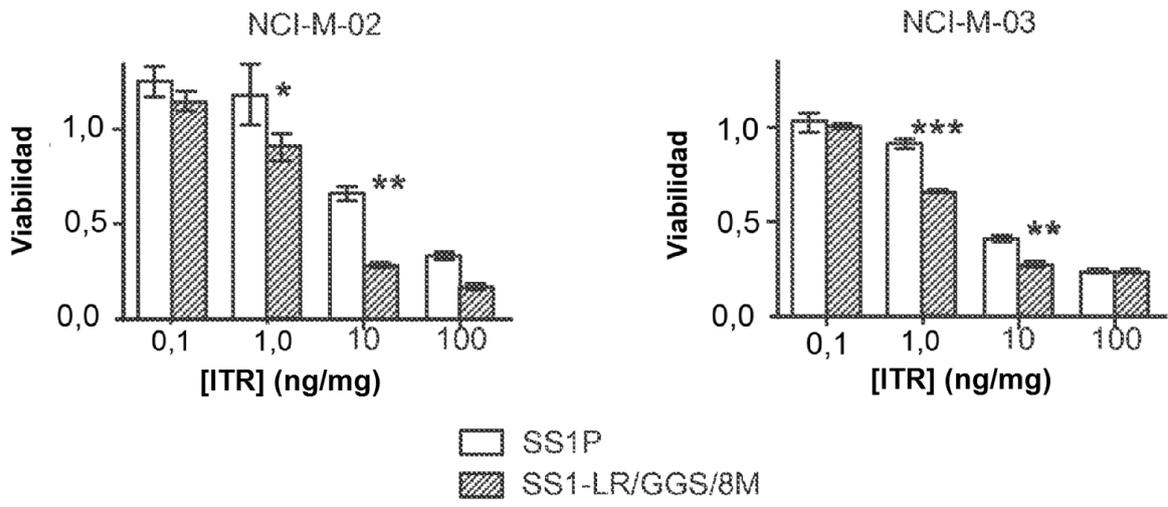


Figura 7

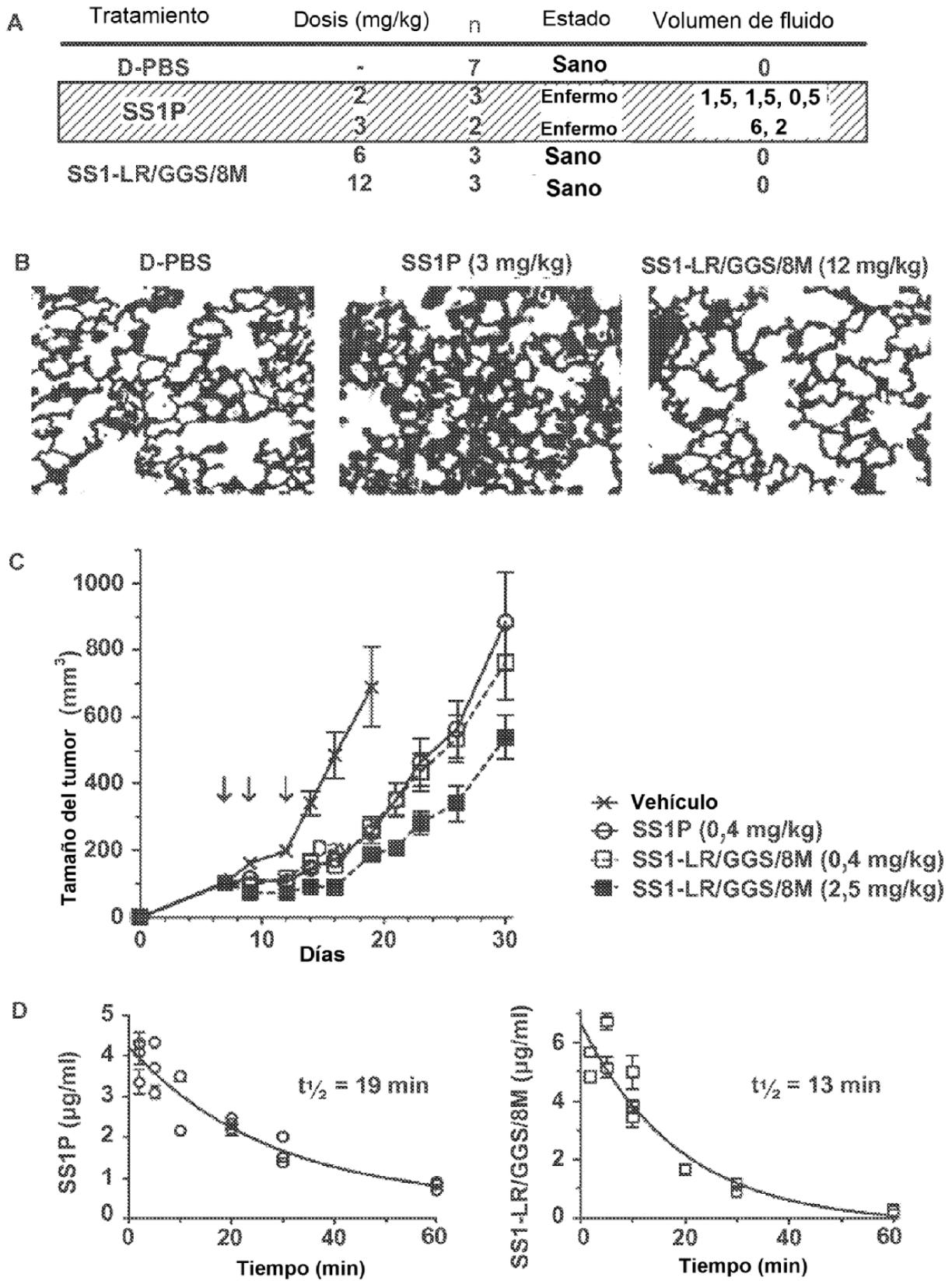


Figura 8

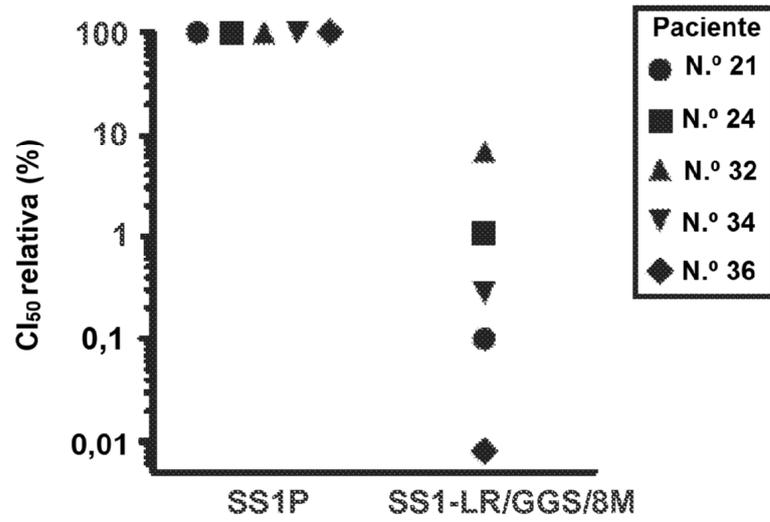


Figura 9

