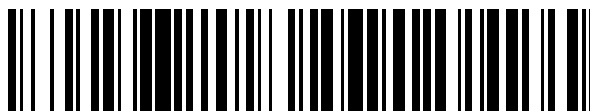


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 131**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2013 PCT/US2013/059883**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14052064**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2013 E 13766859 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2900695**

54 Título: **Anticuerpos de mesotelina y métodos para provocar una potente actividad antitumoral**

30 Prioridad:  
**27.09.2012 US 201261706396 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.05.2018**

73 Titular/es:  
**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS  
REPRESENTED BY THE SECRETARY,  
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN  
SERVICES (100.0%)  
National Institutes of Health Office of Technology  
Transfer 6011 Executive Boulevard Suite 325  
MSC 7660  
Bethesda, MD 20852-7660, US**

72 Inventor/es:  
**HO, MITCHELL;  
PASTAN, IRA, H.;  
DIMITROV, DIMITER, S.;  
TANG, ZHEWEI;  
FENG, MINGQIAN y  
GAO, WEI**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 666 131 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de mesotelina y métodos para provocar una potente actividad antitumoral

## 5 CAMPO

Esta descripción se refiere a anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos monoclonales de dominio único, específicos para mesotelina. Esta descripción se refiere además al uso de dichos anticuerpos, tales como para la detección y el tratamiento del cáncer.

10

## ANTECEDENTES

Se ha sugerido que la mesotelina es una diana terapéutica debido a que está altamente expresada en mesoteliomas malignos (Chang et al., *Cancer Res* 52: 181-186, 1992; Chang y Pastan, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 136-140, 1996) y otros tumores sólidos, tales como cáncer de estómago, carcinomas de células escamosas, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, colangiocarcinoma, cáncer de mama y cáncer de ovario (Hassan et al., *Clin. Cancer Res.* 10:3937-3942, 2004; McGuire et al., *N. Engl. J Med.* 334:1-6, 1996; Argani et al., *Clin. Cancer Res.* 7:3862-3868, 2001; Hassan et al., *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 13:243-247, 2005; Li et al., *Mol. Cancer Ther.* 7:286-296, 2008; Yu et al., *J Cancer* 1:141-1749, 2010; Tchou et al., *Breast Cancer Res Treat* 133(2):799-804, 2012; Patente de Estados Unidos N.º 7.081.518).

El gen de la mesotelina (*MSLN*) codifica una proteína precursora de ~70 kDa que se procesa para una proteína N-terminal de ~30 kDa y una mesotelina madura unida a la membrana C-terminal de ~40 kDa (Hassan y Ho, *Eur J Cancer* 44: 46-53, 2008). Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales antimesotelina (mAb), incluyendo inmunotoxina SS1P y MORAb-009 (también conocido como amatuximab), que actualmente se están evaluando en ensayos clínicos para el mesotelioma y otros cánceres (Hassan y Ho, *Eur J Cancer* 44: 46-53, 2008; Ho, *Biodrugs* 25: 275-284, 2011). SS1P es una inmunotoxina recombinante que consiste en un Fv murino antimesotelina fusionado a una exotoxina de *Pseudomonas* truncada que media la destrucción celular (Pastan y Hassan, *Nat Rev Cancer* 6: 559-565, 2006). Actualmente está en curso un estudio clínico de SS1P junto con quimioterapia. MORAb-009, un anticuerpo quimérico (de ratón/humano) basado en el Fv de SS1 murino, provoca citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en células tumorales portadoras de mesotelina (Hassan et al., *Cancer Immun* 7: 20, 2007).

Los investigadores del U.S. National Cancer Institute (NCI) generaron recientemente dos mAbs completamente humanos (m912 y HN1) que reconocen la mesotelina (Feng et al., *Mol Cancer Ther* 8: 1113-1118, 2009; Ho et al., *Int J Cancer* 128: 2020-2030, 2011). El Fv humano de HN1 se aisló a partir de una biblioteca de presentación en fagos y se generó una IgG completamente humana. También se generó una inmunotoxina HN1 fusionando el Fv de HN1 a una exotoxina truncada de *Pseudomonas A* (PE38) (Ho et al., *Int J Cancer* 128: 2020-2030, 2011). La IgG de HN1 se une a la mesotelina asociada a la superficie celular y destruye las células cancerosas con una ADCC muy fuerte. El anticuerpo humano HN1 reconoce un epítipo conformacional que se superpone al sitio SS1 en la mesotelina, lo que indica que HN1 puede desarrollarse como una versión completamente humana de mAb basados en SS1 (tales como MORAb-009). A pesar del número de mAbs de mesotelina disponibles, ninguno ha mostrado citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra las células tumorales. Por lo tanto, la terapia dirigida a mesotelina actual se ve obstaculizada por la falta de mAb antimesotelina con CDC potente.

45

El CDC es un mecanismo importante de destrucción celular para anticuerpos terapéuticos (Weiner et al., *Nat Rev Immunol* 10: 317-327, 2010). El primer mAb aprobado para la terapia contra el cáncer, rituximab, es parcialmente dependiente de CDC por su actividad antitumoral. En estudios preclínicos, su actividad antitumoral fue completamente eliminada en ratones con deficiencia de C1q (Di Gaetano et al., *J Immunol* 171: 1581-1587, 2003). El agotamiento del complemento también disminuyó su actividad en un modelo de xenoinjerto de linfoma de linfocitos B (Cragg y Glennie, *Blood* 103: 2738-2743, 2004). Se ha sugerido que CDC puede aparecer cuando el sitio de unión a anticuerpo está cerca de la membrana celular (Pawluczko et al., *J Immunol* 183: 749-758, 2009). Como evidencia de esto, ofatumumab, que se une mucho más cerca de la membrana celular que rituximab, también tiene una actividad de CDC mucho mayor (Pawluczko et al., *J Immunol* 183: 749-758, 2009). Casi todos los mAbs de mesotelina e inmunotoxinas existentes (incluyendo HN1 y SS1P/MORAb-009) reconocen la Región I, el extremo N-terminal de la mesotelina de superficie celular que se supone está situado lejos de la membrana celular (Kaneko et al., *JBiol Chem* 284: 3739-3749, 2009). <El documento WO 2010/111282 describe scFv humano contra mesotelina humana. El documento WO 2007/016150 describe SS1P de antimesotelina condensada a PE38>.

50

55

**RESUMEN**

La invención se define en las reivindicaciones.

5 En el presente documento se describen anticuerpos humanos de dominio único (VH) específicos de mesotelina (denominados como SD1 y SD2). El anticuerpo SD1 se une a un epítipo conformacional en el extremo C-terminal de la mesotelina humana y presenta una fuerte actividad de CDC, así como ADCC, contra las células tumorales que expresan mesotelina. SD2 es específico para la mesotelina humana de longitud completa, pero no se une a un péptido de mesotelina C-terminal de mesotelina.

10

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos monoclonales que comprenden una o más (tales como las tres) CDR de SD1 o SD2. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento incluyen moléculas de inmunoglobulina, tales como anticuerpos IgG, así como fragmentos de anticuerpos y anticuerpos de dominio único (VH). Se proporcionan adicionalmente composiciones que incluyen los anticuerpos que se unen, por ejemplo, se unen específicamente, a mesotelina, moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico, y células huésped aisladas que expresan las moléculas de ácido nucleico. También se proporcionan inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos descritos en el presente documento y una molécula efectora, tal como una toxina. También se proporcionan proteínas de fusión que comprenden los anticuerpos, tales como proteínas de fusión que comprenden Fc humano.

20

Los anticuerpos y composiciones proporcionados en el presente documento pueden usarse para una diversidad de propósitos, tales como para confirmar el diagnóstico de un cáncer que expresa mesotelina, por ejemplo, mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (como cáncer de mama triple negativo) o cáncer de ovario. Por lo tanto, en el presente documento se proporciona un método para confirmar el diagnóstico de cáncer en un sujeto poniendo en contacto una muestra del sujeto diagnosticado con cáncer con un anticuerpo monoclonal que se une a la mesotelina, y detectando la unión del anticuerpo a la muestra. Un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra con respecto a la unión del anticuerpo a una muestra de control confirma el diagnóstico de cáncer. En algunas realizaciones, el método incluye además poner en contacto un segundo anticuerpo que reconoce específicamente el anticuerpo específico de mesotelina la muestra, y detectar la unión del segundo anticuerpo.

30

De manera similar, se proporciona en el presente documento un método para detectar un cáncer que expresa mesotelina en un sujeto. El método incluye poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento, y detectar la unión del anticuerpo a la muestra. Un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra con respecto a una muestra de control detecta cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además poner en contacto un segundo anticuerpo que reconoce específicamente el anticuerpo específico de mesotelina con la muestra, y detectar la unión del segundo anticuerpo.

35

Se proporciona además un método para tratar un sujeto que tiene un cáncer que expresa mesotelina, por ejemplo mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (tal como cáncer de mama triple negativo) o cáncer de ovario, seleccionando un sujeto que tenga un cáncer que exprese mesotelina y administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal específico para mesotelina, o un inmunoconjugado, proteína de fusión o composición que comprenda el anticuerpo.

45

También se proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral o metástasis de un cáncer que expresa mesotelina en un sujeto seleccionando un sujeto que tenga un cáncer que exprese mesotelina y administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, inmunoconjugado, proteína de fusión o la composición descrita en el presente documento.

50

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que transcurre con referencia a las figuras adjuntas.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

55

**Figuras 1A-1D: Generación de un anticuerpo humano de dominio único para el extremo C-terminal de la mesotelina.** (Figura 1A) Diseño del péptido usado para cribar anticuerpos humanos mediante tecnología de presentación en fagos. Se proponen tres regiones funcionales en la mesotelina unida a la membrana: Región I: 296-390; Región II: 391-486; Región III: 487-598 (de SEQ ID NO: 9). Se indican los

tres glicanos unidos a N (Asn388, Asn488 y Asn515) en la mesotelina de la superficie celular. El péptido utilizado en el presente estudio contiene 50 residuos en el extremo C-terminal de la mesotelina (residuos 539-588 de SEQ ID NO: 9). (Figura 1B) Se usó una biblioteca de presentación en fagos del dominio de anticuerpo humano (VH) modificado para cuatro rondas de selección de fagos en el péptido de mesotelina C-terminal (residuos 539-588). (Figura 1C) Se realizaron experimentos de ELISA de fagos monoclonales al final de la cuarta ronda de inmunopurificación. El clon del fago SD1 (clon 1) se seleccionó para un análisis adicional porque unía tanto la mesotelina de longitud completa como el péptido C-terminal con señales fuertes. (Figura 1D) Se realizaron experimentos de ELISA de fagos monoclonales usando dos clones de fagos de anticuerpos seleccionados (SD1 y SD2). El clon SD1 se une a la mesotelina humana de longitud completa (MSLN) y al péptido mesotelina. El clon SD2 se une solo a MSLN, no al péptido.

**Figuras 2A-2B: Producción y análisis de la proteína de fusión Fc humana SD1.** (Figura 2A) Análisis de SDS-PAGE de SD1-hFc purificada (4 µg de proteína por carril) en condiciones no reductoras y reductoras. La pureza de la proteína SD1-hFc fue superior al 95%. NR: sin reducción; R: reducción. (Figura 2B) Inmunoprecipitación de proteína mesotelina endógena en A431/H9 (expresión forzada de mesotelina en línea celular de carcinoma epidermoide A431) (Ho et al., Clin Cancer Res 11: 3814-3820, 2005), extractos de células NCI-H226 (mesotelioma) y KMBC (colangiocarcinoma). Se usó SD1 para inmunoprecipitar la proteína mesotelina endógena en el lisado celular. C: una fusión Fc humana de dominio único VH irrelevante; IP: inmunoprecipitación; Entrada: Transferencia western en lisados de células enteras antes de la inmunoprecipitación.

**Figuras 3A-3D: Propiedades de unión de SD1-hFc.** (Figura 3A) ELISA directo. SD1-hFc se unió a la proteína mesotelina humana de longitud completa (MSLN) y al péptido, pero no a la mesotelina de ratón (mMSLN) o BSA. (Figura 3B) ELISA de competición. El péptido mesotelina, no SS1P, HN1 o un péptido irrelevante que contenía 50 residuos, compitió con la unión de SD1-hFc a la proteína mesotelina humana. (Figura 3C) El equilibrio de disociación  $K_D$  de SD1-hFc a la proteína mesotelina humana fue de 13, 58 nM (Figura 3D) 16,08 nM para el péptido.

**Figura 4: Análisis de citometría de flujo de la proteína SD1-hFc en células cancerosas que expresan mesotelina y de control.** SD1-hFc se unió a la línea celular A431/H9 transfectada con ADNc de mesotelina estable y no a la línea celular A431. El anticuerpo también se unió a tres de las cuatro líneas de células cancerosas humanas ensayadas en el presente estudio. OVCAR8: cáncer de ovario; NCI-H226: mesotelioma; EKVX y L55: NSCLC; KMBC, Mz-ChA-1 y HuCCT1: colangiocarcinoma.

**Figuras 5A-5H: SD1-hFc causó CDC y ADCC contra células cancerosas de expresión de mesotelina.** (Figuras 5A, 5B) Ensayos de CDC. Las células A431/H9 (Figura 5A) y NCI-H226 (Figura 5B) se incubaron con concentraciones crecientes de SD1-hFc en presencia de suero humano normal (NHS, 20% vol/vol) como fuente de complemento. La proteína del complemento C1q se unió a células H9 (Figura 5C) y NCI-H226 (Figura 5D) en presencia de SD1-hFc, no de HN1 o una proteína de fusión hFc de control. (Figuras 5E-5H) Ensayos de ADCC. Se incubaron PBMC recién aisladas con las células diana A431/H9 (Figura 5E) o NCI-H226 (Figura 5F) en una relación de 50:1, en presencia de SD1-hFc con concentraciones crecientes. Se incubaron células NK humanas purificadas con las células diana A431/H9 (Figura 5G) o NCI-H226 (Figura 5H) a diferentes relaciones E:T con 50 µg/ml de SD1-hFc. La actividad de CDC y ADCC se determinó mediante el ensayo de LDH (\*:  $p < 0,05$ ).

**Figuras 6A-6D: Fuerte efecto antitumoral de SD1-hFc sobre el crecimiento tumoral.** (Figura 6A) Se inocularon células A431/H9 en el costado de ratones sin pelo para establecer tumores de aproximadamente 70 mm<sup>3</sup> de tamaño. Desde el día 7, los ratones se trataron con SD1-hFc (50 mg/kg) o PBS cada dos días. Las flechas que apuntan hacia abajo indican el día de las inyecciones. El tamaño promedio del tumor para cada grupo de tratamiento se calculó los días 7-20 (\*:  $p < 0,05$ ). (Figura 6B) Se incubaron células A431/H9 con 100 µg/ml de SD1-hFc en presencia de suero de ratón normal (30% vol/vol) como fuente de complemento de ratón. La actividad de CDC se midió mediante ensayo de LDH (\*:  $p < 0,05$ ). (Figura 6C) Las células A431/H9 se incubaron con 100 µg/ml de SD1-hFc en presencia de células NK de ratón purificadas como fuente de células efectoras de ratón. La actividad ADCC de ratón se midió mediante ensayo de LDH (\*:  $p < 0,05$ ). (Figura 6D) La pureza de las células NK de ratón.

**Figuras 7A-7B: Producción y análisis de la inmunotoxina recombinante basada en SD1.** (Figura 7A) Análisis de SDS-PAGE de SD1-PE38 purificada (4 µg de proteína por carril) en condiciones no reductoras. La pureza de SD1-PE38 fue mayor del 95%. IT: inmunotoxina. (Figura 7B) Ensayos de WST-8 en células A431/H9, A431, NCI-H226 y KMBC tratadas con la inmunotoxina SD1-PE38.

## LISTA DE SECUENCIAS

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos enumeradas en la lista de secuencias adjunta se muestran usando abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos, y un código de tres letras para aminoácidos,

como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solamente se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada. La lista de secuencias se envía como un archivo de texto ASCII, creado el 11 de septiembre de 2013, 26,7 KB. En la lista de secuencias adjunta:

5

**SEQ ID NO: 1** es la secuencia de nucleótidos del anticuerpo de dominio único SD1.  
**SEQ ID NO: 2** es la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de dominio único SD1.  
**SEQ ID NO: 3** es la secuencia de aminoácidos de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE).  
**SEQ ID NO: 4** es la secuencia de aminoácidos de PE38.  
**SEQ ID NO: 5** es la secuencia de aminoácidos de PE-LR.  
**SEQ ID NO: 6** es la secuencia de aminoácidos de PE-LR/6X  
**SEQ ID NO: 7** es la secuencia de aminoácidos de PE con inmunogenicidad reducida.  
**SEQ ID NO: 8** es la secuencia de aminoácidos de PE-LR/8M.  
**SEQ ID NO: 9** es la secuencia de aminoácidos de mesotelina humana.  
**SEQ ID NOS: 10-13** son secuencias de cebador.  
**SEQ ID NO: 14** es la secuencia de nucleótidos del anticuerpo de dominio único SD2.  
**SEQ ID NO: 15** es la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de dominio único SD2.

10

15

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

20

### I. Abreviaturas

ADCC	citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos
CAR	receptor de antígeno quimérico
25 CDC	citotoxicidad dependiente del complemento
ADNc	ADN complementario
CDR	región determinante de la complementariedad
CTL	linfocito T citotóxico
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
30 EM	molécula efectora
FACS	clasificación celular activada por fluorescencia
GPI	glicosilfosfatidilinositol
hFc	Fc humano
HRP	peroxidasa de rábano picante
35 Ig	inmunoglobulina
i.v.	intravenoso
K <sub>D</sub>	constante de disociación
LDH	lactato deshidrogenasa
mAb	anticuerpo monoclonal
40 MAC	complejo de ataque a membrana
mMSLN	mesotelina murina
MSLN	mesotelina
NHS	suero humano normal
PBMC	células mononucleares de sangre periférica
45 PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PE	Exotoxina <i>Pseudomonas</i>
PE	ficoeritrina
ufp	unidades formadoras de placa
RIPA	ensayo de radioinmunoprecipitación
50 VH	variable pesada
VL	variable ligera

### II. Términos y métodos

55 A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995

(ISBN 1-56081-569-8).

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

5

**Anticuerpo:** Un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera que reconoce y se une (tal como reconoce específicamente y se une específicamente) a un epítipo de un antígeno, tal como mesotelina, o un fragmento del mismo. Las moléculas de inmunoglobulina están compuestas por una cadena pesada y una cadena ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominada región variable pesada ( $V_H$ ) y región variable ligera ( $V_L$ ). Juntas, la región  $V_H$  y la región  $V_L$  son responsables de la unión del antígeno reconocido por el anticuerpo.

10

Los anticuerpos incluyen inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de anticuerpos ya conocidos en la técnica, tales como anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos del dominio  $V_H$ ), fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos  $F(ab)'_2$ , proteínas Fv de cadena sencilla ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un enlazador, mientras que en dsFvs, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término "anticuerpo" también incluye formas genéticamente modificadas tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véanse también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ª Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

20

Típicamente, una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Existen cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

25

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como "dominios"). En combinación, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". La extensión de la región marco y las CDR se ha definido de acuerdo con Kabat *et al.* (véase, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) y la base de datos ImMunoGeneTics (IMGT) (véase, Lefranc, Nucleic Acids Res 29: 207-9, 2001). Las bases de datos IMGT y Kabat están disponibles en línea. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie, tal como seres humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en un espacio tridimensional.

40

Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N, y a menudo se identifican típicamente por la cadena en la que está localizada la CDR particular. Por lo tanto, una CDR3  $V_H$  (o H-CDR3) está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1  $V_L$  (o L-CDR1) es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo que se une a mesotelina, por ejemplo, tendrá una región  $V_H$  específica y la secuencia de la región  $V_L$ , y por lo tanto, secuencias de CDR específicas. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de anticuerpo a anticuerpo, solamente un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente implicadas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de la especificidad (SDR).

45

50

Las referencias a " $V_H$ " o " $VH$ " 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 " $VL$ " se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

55

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectedo los genes de cadena ligera y/o pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, fabricando células híbridas que

forman anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células esplénicas inmunes. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Un "anticuerpo quimérico" contiene elementos estructurales de dos o más moléculas de anticuerpo diferentes, a menudo de diferentes especies animales. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede tener residuos estructurales de una especie, tal como ser humano, y CDR (que generalmente confieren unión a antígeno) de otra especie, tal como un anticuerpo murino que se une específicamente a la mesotelina.

Un anticuerpo "humano" (también denominado anticuerpo "completamente humano") es un anticuerpo que incluye regiones marco humanas y todas las CDR de una inmunoglobulina humana. En un ejemplo, el marco y las CDR son de la misma secuencia de aminoácidos de cadena pesada y/o ligera de origen humano. Sin embargo, los marcos de un anticuerpo humano se pueden modificar para incluir CDR de un anticuerpo humano diferente. Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo un ratón, conejo, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante", y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina un "aceptor". En una realización, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, idénticas al menos aproximadamente un 85-90%, tal como aproximadamente un 95% o más. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y una inmunoglobulina de cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. El marco aceptor de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras de aminoácidos adicionales que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas humanizadas se pueden construir por medio de ingeniería genética (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.585.089).

**Afinidad de unión:** Afinidad de un anticuerpo por un antígeno. En una realización, la afinidad se calcula por una modificación del método de Scatchard descrito por Frankel et al. (Mol. Immunol., 16: 101-106, 1979). En otra realización, la afinidad de unión se mide mediante una velocidad de disociación de antígeno/anticuerpo. En otra realización, se mide una alta afinidad de unión mediante un radioinmunoensayo de competición. En otra realización, la afinidad de unión se mide por ELISA. Un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno (como mesotelina) es un anticuerpo que se une al antígeno con alta afinidad y no se une significativamente a otros antígenos no relacionados.

**Cáncer de mama:** Un tipo de cáncer que se forma en los tejidos de la mama, generalmente los conductos (tubos que transportan la leche al pezón) y los lóbulos (glándulas que producen leche). **Cáncer de mama triple negativo** se refiere a un tipo de cáncer de mama en el que las células cancerosas no expresan receptores de estrógeno, receptores de progesterona o niveles significativos de proteína HER2/neu. El cáncer de mama triple negativo también se denomina cáncer de mama ER-negativo PR-negativo HER2/neu-negativo.

**Agente quimioterapéutico:** Cualquier agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular anormal. Dichas enfermedades incluyen tumores, neoplasias y cáncer, así como enfermedades caracterizadas por un crecimiento hiperplásico, tal como psoriasis. En una realización, un agente quimioterapéutico es un agente de uso en el tratamiento del mesotelioma u otro tumor, tal como cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, colangiocarcinoma, cáncer de mama, (tal como cáncer de mama triple negativo) u cáncer de ovario. En una realización, un agente quimioterapéutico es un compuesto radioactivo. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico de uso (véase, por ejemplo, Slapak y Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición; Perry et al., Chemotherapy, Cap. 17 en Abeloff, Clinical Oncology 2ª ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer, L., Berkery, R. (eds.): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer, D.S., Knobf, M.F., Durivage, H.J. (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993). La quimioterapia de combinación es la administración de más de un agente para tratar el cáncer. Un ejemplo es la administración de un anticuerpo (o inmunoconjugado) que se une a la mesotelina usada en combinación con un compuesto radioactivo o químico.

**Colangiocarcinoma:** Un tipo de cáncer que se desarrolla en las células que recubren los conductos biliares en el

hígado.

**Variante conservativa:** Las sustituciones de aminoácidos "conservativas" son aquellas sustituciones que no afectan sustancialmente ni disminuyen la afinidad de una proteína, tal como un anticuerpo contra mesotelina. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a mesotelina puede incluir como máximo aproximadamente 1, como máximo aproximadamente 2, como máximo aproximadamente 5, como máximo aproximadamente 10, o como máximo aproximadamente 15 sustituciones conservativas y se unen específicamente al polipéptido mesotelina. El término "variante conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido, con la condición de que el anticuerpo se una específicamente a mesotelina. Las sustituciones no conservativas son aquellas que reducen una actividad o se unen a mesotelina.

Las tablas de sustitución de aminoácidos conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien por los expertos en la técnica. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí:

- 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).

**Región determinante de complementariedad (CDR):** Secuencias de aminoácidos que definen juntas la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de Ig nativa. Las cadenas ligera y pesada de una Ig tienen cada una tres CDR designadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente.

**Contacto:** Colocación en asociación física directa; incluye tanto en forma sólida como líquida.

**Citotoxicidad:** La toxicidad de una molécula, tal como una inmunotoxina, para las células destinadas a dirigirse, en oposición a las células del resto de un organismo. En una realización, en cambio, el término "toxicidad" se refiere a la toxicidad de una inmunotoxina para células distintas de las que son las células destinadas a dirigirse por el resto de direccionamiento de la inmunotoxina, y el término "toxicidad animal" se refiere a la toxicidad de la inmunotoxina a un animal por toxicidad de la inmunotoxina a células distintas de las destinadas a dirigirse por la inmunotoxina.

**Variante degenerada:** En el contexto de la presente descripción, una "variante degenerada" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido mesotelina o un anticuerpo que se une a mesotelina que incluye una secuencia que está degenerada como resultado del código genético. Hay 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales se especifican por más de un codón. Por lo tanto, se incluyen todas las secuencias de nucleótidos degeneradas siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido mesotelina o anticuerpo que se une a mesotelina codificada por la secuencia de nucleótidos no se modifique.

**Diagnóstico:** La identificación de la presencia o naturaleza de una afección patológica, tal como, pero sin limitación, cáncer. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de positivos verdaderos). La "especificidad" de un ensayo de diagnóstico es uno menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de falsos positivos se define como la proporción de aquellos sin la enfermedad que dan positivo. Aunque un método de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que facilite el diagnóstico. "Pronóstico" es la probabilidad de desarrollo (por ejemplo, gravedad) de una afección patológica, tal como cáncer o metástasis.

**Molécula efectora:** La porción de una molécula quimérica que se pretende que tenga un efecto deseado sobre una célula a la que se dirige la molécula quimérica. La molécula efectora también se conoce como un resto efector (EM), agente terapéutico, o agente de diagnóstico, o términos similares.

Los agentes terapéuticos incluyen dichos compuestos como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glucoproteínas, radioisótopos, lípidos, carbohidratos o virus recombinantes. Los restos terapéuticos y de diagnóstico de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivatizados para reticulación covalente con ADN simple o dúplex, y oligonucleótidos formadores de tríplex. Como alternativa, la molécula unida a un resto de direccionamiento, tal como un anticuerpo antimmesotelina, puede ser un sistema de encapsulación, tal



como un liposoma o micela, que contiene una composición terapéutica tal como un fármaco, un ácido nucleico (tal como un ácido nucleico antisentido), u otro resto terapéutico que puede protegerse de la exposición directa al sistema circulatorio. Los medios para preparar liposomas unidos a anticuerpos se conocen bien por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.957.735; y Connor et al., Pharm Ther 28: 341-5 365, 1985). Los agentes o restos de diagnóstico incluyen radioisótopos y otros marcadores detectables. Los marcadores detectables útiles para tales propósitos también se conocen bien en la técnica, e incluyen isótopos radiactivos tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{125}\text{I}$ , fluoróforos, agentes quimioluminiscentes y enzimas.

10 **Epítipo:** Un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias de péptidos en una molécula que son antigénicas, es decir, que provocan una respuesta inmune específica. Un anticuerpo se une específicamente a un epítipo antigénico particular en un polipéptido, tal como mesotelina.

**Región marco:** Secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR. Las regiones marco incluyen regiones marco variables ligeras y variables pesadas. Las regiones marco sirven para mantener las CDR en una orientación apropiada para la unión al antígeno.

20 **Células huésped:** Células en las que se puede propagar un vector y se expresa su ADN. La célula puede ser procariota o eucariota. El término también incluye cualquier progenie de la célula huésped objeto. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica a la célula precursora ya que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Sin embargo, dicha progenie se incluye cuando se usa la expresión "célula huésped".

25 **Hibridoma:** Una célula híbrida para la producción de anticuerpos monoclonales. Se produce un hibridoma por fusión de una célula productora de anticuerpos (tal como un linfocito B obtenido de un animal inmunizado, por ejemplo, un ratón, rata o conejo) y una célula de mieloma.

30 **Respuesta inmune:** Una respuesta de una célula del sistema inmune, tal como un linfocito B, linfocito T o monocito, a un estímulo. En una realización, la respuesta es específica para un antígeno particular (una "respuesta específica de antígeno"). En una realización, una respuesta inmune es una respuesta de linfocitos T, tal como una respuesta a  $\text{CD4}^+$  o una respuesta a  $\text{CD8}^+$ . En otra realización, la respuesta es una respuesta a linfocitos B, y da como resultado la producción de anticuerpos específicos.

35 **Inmunconjugado:** Un enlace covalente de una molécula efectora a un anticuerpo o fragmento funcional de la misma. La molécula efectora puede ser un marcador detectable o una inmunotoxina. Los ejemplos específicos y no limitantes de toxinas incluyen, pero sin limitación, abrina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE, tal como PE35, PE37, PE38 y PE40), toxina de la difteria (DT), toxina botulínica, o toxinas modificadas de las mismas, u otros agentes tóxicos que inhiben directa o indirectamente el crecimiento celular o destruyen las células. Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que típicamente provocan la muerte a través de la toxicidad hepática. Sin embargo, PE y DT pueden modificarse en una forma para su uso como inmunotoxina eliminando el componente de 40 direccionamiento nativo de la toxina (tal como el dominio Ia de PE y la cadena B de DT) y reemplazándolo con un resto de direccionamiento diferente, tal como un anticuerpo. Una "molécula quimérica" es un resto de direccionamiento, tal como un ligando o un anticuerpo, conjugado (acoplado) a una molécula efectora. El término "conjugado" o "ligado" se refiere a hacer dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua. En una realización, un anticuerpo se une a una molécula efectora. En otra realización, un anticuerpo unido a una molécula 45 efectora se une además a un lípido u otra molécula a una proteína o péptido para aumentar su semivida en el cuerpo. El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. En una realización, la unión es química, en la que una reacción entre el resto del anticuerpo y la molécula efectora ha producido un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula. Un enlazador peptídico (secuencia de péptido corta) puede incluirse opcionalmente entre el anticuerpo y la molécula efectora. Debido a que los inmunconjugados se 50 prepararon originalmente a partir de dos moléculas con funcionalidades separadas, tales como un anticuerpo y una molécula efectora, también se denominan a veces "moléculas quiméricas". La expresión "molécula quimérica", como se usa en el presente documento, se refiere, por lo tanto, a un resto de direccionamiento, tal como un ligando o un anticuerpo, conjugado (acoplado) a una molécula efectora.

55 **Aislado:** Un componente biológico "aislado", tal como un ácido nucleico, proteína (incluyendo anticuerpos) u orgánulos, se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos del entorno (tal como una célula) en los que el componente se produce de forma natural, es decir, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también incluye ácidos nucleicos y

proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

**Marcador:** Un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con otra molécula, tal como un anticuerpo o una proteína, para facilitar la detección de esa molécula. Los ejemplos específicos y no limitantes de marcadores incluyen etiquetas fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos. En un ejemplo, un "anticuerpo marcado" se refiere a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. Por ejemplo, la etiqueta es un marcador detectable, tal como la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos biotínico que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o colorimétricos). Se conocen en la técnica y se pueden usar diversos métodos para marcar polipéptidos y glucoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionucleótidos (tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{125}\text{I}$ ), marcadores fluorescentes (tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, fosforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (tales como peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (tal como secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítopo), o agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. En algunas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

**Enlazador:** En algunos casos, un enlazador es un péptido dentro de un fragmento de unión a anticuerpo (tal como un fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente la cadena pesada variable a la cadena ligera variable. "Enlazador" también se puede referir a un péptido que sirve para unir un resto de direccionamiento, tal como un anticuerpo, a una molécula efectora, tal como una citotoxina o un marcador detectable.

Los términos "conjugación", "unión", "enlace" o "ligadura" se refieren a hacer dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua, o a unir covalentemente un radionúclido u otra molécula a un polipéptido, tal como un scFv. En el contexto específico, los términos incluyen referencia a la unión a un ligando, tal como un resto de anticuerpo, a una molécula efectora. El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. "Medios químicos" se refiere a una reacción entre el resto de anticuerpo y la molécula efectora de tal forma que existe un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula.

**Cáncer de pulmón:** Cáncer que se forma en los tejidos del pulmón, normalmente en las células que revisten los conductos de aire. Los dos tipos principales son cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Estos tipos se diagnostican basándose en cómo se ven las células bajo el microscopio.

**Mamífero:** Este término incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De manera similar, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios.

**Mesotelina:** Una glucoproteína ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) de la superficie celular de 40 kDa. La proteína mesotelina humana se sintetiza como un precursor de 70 kD que luego se procesa proteolíticamente. El extremo amino de 30 kD de la mesotelina se secreta y se denomina factor potenciador de megacariocitos (Yamaguchi et al., J. Biol. Chem. 269: 805-808, 1994). El extremo carboxilo de 40 kD permanece unido a la membrana como mesotelina madura (Chang et al., Natl. Acad. Sci. USA 93: 136-140, 1996). Los ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de mesotelina son como se describen en la Publicación PCT N.º WO 97/25,068; la Patente de Estados Unidos N.º 6.083.502; Chang y Pastan, Int. J. Cancer 57: 90, 1994; Chang y Pastan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 136, 1996; Brinkmann et al., Int. J. Cancer 71:638, 1997; y Chowdhury et al., Mol. Immunol. 34: 9, 1997. La secuencia de aminoácidos de la mesotelina humana se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 9. Mesotelina también se refiere a proteínas o polipéptidos de mesotelina que permanecen intracelulares, así como a proteína mesotelina extracelular secretada y/o aislada.

**Mesotelioma:** Un tipo de neoplasia derivada de las células de revestimiento de la pleura y el peritoneo que crece como una lámina gruesa que cubre las vísceras, y está compuesta de por células fusiformes o tejido fibroso que puede encerrar espacios tipo glándula alineados por células cuboidales. Los mesoteliomas a menudo se originan en el tejido que recubre el pulmón, el corazón o el abdomen. En algunos casos, los mesoteliomas son causados por la exposición al amianto.

**MORAb-009:** Una IgG/k quimérica (de ratón/humano) monoclonal con alta afinidad y especificidad para mesotelina. Las regiones VH y VL de scFv de antimesotelina de ratón se obtuvieron mediante inmunopurificación de una biblioteca de presentación en fagos preparada a partir de ARNm esplénico de un ratón inmunizado con ADNc de mesotelina en células positivas a mesotelina. Las regiones VH y VL se injertaron en marco con regiones constantes de IgG1 y kappa humanas (Hassan y Ho, Eur J Cancer 44(1): 46-53, 2008).

**Neoplasia, neoplasia maligna, cáncer o tumor:** Una neoplasia es un crecimiento anormal de tejido o células que es resultado de una división celular excesiva. El crecimiento neoplásico puede producir un tumor. La cantidad de un tumor en un individuo es la "carga tumoral" que se puede medir como la cantidad, el volumen o el peso del tumor.

10 Un tumor que no metastatiza se conoce como "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o puede metastatizar se conoce como "maligno". Los ejemplos de tumores hematológicos incluyen leucemias, que incluyen leucemias agudas (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tal como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera,

15 linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovoma, mesotelioma, colangiocarcinoma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, neoplasia linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma

25 papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tal como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

30 En varios ejemplos, el catalizador es mesotelioma, cáncer de estómago, carcinomas de células escamosas, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, colangiocarcinoma, cáncer de mama o cáncer de ovario.

**Unido operativamente:** Una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor, tal como el promotor CMV, está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

40 **Cáncer de ovario:** Cáncer que se forma en los tejidos del ovario (una de un par de glándulas reproductoras femeninas en las que se forman los óvulos o los huevos. La mayoría de los cánceres de ovario son carcinomas epiteliales ováricos (cáncer que comienza en las células de la superficie del ovario) o tumores de células germinales malignas (cáncer que comienza en las células del huevo).

45 **Cáncer de páncreas:** Enfermedad en la que se encuentran células neoplásicas (cancerosas) en los tejidos del páncreas. También denominado cáncer exocrino.

50 **Agente farmacéutico:** Un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra apropiadamente a un sujeto o una célula.

**Vehículos farmacéuticamente aceptables:** Los vehículos de uso farmacéuticamente aceptables son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición, 1975, describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los anticuerpos descritos en el presente documento.

55 En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticos y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa

acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (tales como formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitán.

**Prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad:** "Prevenir" una enfermedad se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que ha comenzado a desarrollarse, tal como una reducción en la carga tumoral o una disminución en el número de tamaño de metástasis. "Mejora" se refiere a la reducción en el número o la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad, tal como cáncer.

**Cáncer de próstata:** cáncer que se forma en los tejidos de la próstata (una glándula en el sistema reproductor masculino que se encuentra debajo de la vejiga y frente al recto). El cáncer de próstata por lo general se da en hombres mayores.

**Purificado:** El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, pretende ser un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación peptídica purificada es aquella en la que el péptido o proteína está más enriquecida que el péptido o la proteína en su entorno natural dentro de una célula. En una realización, se purifica una preparación de manera que la proteína o péptido representa al menos el 50% del contenido total de péptido o proteína de la preparación. La purificación sustancial representa la purificación de otras proteínas o componentes celulares. Una proteína sustancialmente purificada tiene al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de pureza. Por lo tanto, en un ejemplo específico no limitante, una proteína sustancialmente purificada está libre en un 90% de otras proteínas o componentes celulares.

**Recombinante:** Un ácido nucleico recombinante es uno que tiene una secuencia que no se produce de forma natural o tiene una secuencia que se hace mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial a menudo se logra por síntesis química o por la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

**Toxinas recombinantes:** Proteínas quiméricas en las que un resto de direccionamiento celular se fusiona con una toxina (Pastan et al., *Science*, 254: 1173-1177, 1991). Si el resto de direccionamiento celular es la porción Fv de un anticuerpo, la molécula se denomina inmunotoxina recombinante (Chaudhary et al., *Nature*, 339: 394-397, 1989). El resto de toxina está alterado genéticamente, de manera que no se puede unir al receptor de toxina presente en la mayoría de las células normales. Las inmunotoxinas recombinantes destruyen selectivamente las células que se reconocen por el dominio de unión al antígeno. Estas toxinas e inmunotoxinas recombinantes se pueden usar para tratar cáncer, por ejemplo, un cáncer en el que se expresa mesotelina.

**Muestra (o muestra biológica):** Un espécimen biológico que contiene ADN genómico, ARN (incluido ARNm), proteína o combinaciones de los mismos, obtenidos de un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, sangre periférica, tejido, células, orina, saliva, biopsia de tejido, aspiración con aguja fina, muestra quirúrgica, y material de autopsia. En un ejemplo, una muestra incluye una biopsia tumoral, tal como una biopsia tumoral.

**Identidad de secuencia:** La similitud entre las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se expresa en cuanto a la similitud entre las secuencias, de lo contrario se denomina identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide con frecuencia en cuanto a porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes de un polipéptido o molécula de ácido nucleico poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencia al alinearse usando métodos estándar.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineamiento en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene* 73: 237, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16: 10881, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444, 1988. Altschul et al., *Nature Genet.* 6: 119, 1994, presenta una consideración detallada de los métodos de alineamiento de secuencias y los cálculos de homología.

La herramienta de búsqueda de alineamiento local básica del NCBI (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI,

Bethesda, MD) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en el sitio web del NCBI en Internet.

- 5 Los homólogos y variantes de una  $V_L$  o una  $V_H$  de un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina o un fragmento de la misma se caracterizan típicamente por la posesión de al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% de identidad de secuencia contada a lo largo de la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo utilizando el NCBI Blast 2.0, blastp con huecos ajustado a los parámetros por defecto. Para las comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función de secuencias Blast 2 usando la matriz predeterminada BLOSUM62 ajustada a parámetros por defecto, (coste de existencia de huecos de 11, y un coste de hueco de residuo de 1). Al alinear péptidos cortos (menos de aproximadamente 30 aminoácidos), el alineamiento debe realizarse usando la función de secuencias Blast 2, empleando la matriz PAM30 ajustada a parámetros predeterminados (hueco abierto 9, penalizaciones de hueco de extensión 1). Las proteínas con una similitud aún mayor a las secuencias de referencia mostrarán cada vez más identidades porcentuales cuando se evalúen con este método, como al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia. Cuando se compara menos de toda la secuencia para determinar la identidad de secuencia, los homólogos y las variantes poseerán típicamente al menos un 80% de identidad de secuencia en ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencia de al menos un 85% o al menos un 90% o un 95% dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de secuencia en ventanas cortas están disponibles en el sitio web del NCBI en Internet. Un experto en la técnica apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan solo como guía; es completamente posible que puedan obtenerse homólogos muy significativos que estén fuera de los intervalos proporcionados.

25 **Carcinoma de células escamosas:** Una neoplasia maligna derivada del epitelio escamoso estratificado, pero que también puede aparecer en sitios tales como la mucosa bronquial, donde el epitelio glandular o columnar está normalmente presente. El carcinoma de células escamosas es el tipo más común de cáncer de piel.

- 30 **SS1P:** Una inmunotoxina recombinante que consiste en un Fv antimesotelina (el mismo Fv que MORAb-009) unido a una exotoxina de *Pseudomonas* truncada que media la destrucción celular (Chowdhury y Pastan, Nat Biotechnol 17: 568-572, 1999; Pastan et al., Nat Rev Cancer 6: 559-565, 2006). SS1P, también conocida como CAT-5001, es citotóxica para líneas celulares que expresan mesotelina, causa la regresión completa de xenotrasplantes tumorales que expresan mesotelina en ratones sin pelo, y es citotóxica para células obtenidas de pacientes con cáncer humano (Hassan et al., Clin Cancer Res 10: 3937-3942, 2001; Hassan et al., Clin Cancer Res 8: 3520-3526, 2002).

**Cáncer de estómago:** Cáncer que se forma en los tejidos que revisten el estómago. También denominado cáncer gástrico.

- 40 **Sujeto:** Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye sujetos tanto humanos como veterinarios, incluyendo mamíferos humanos y no humanos.

**Sintético:** Producido por medios artificiales en un laboratorio, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido mediante tecnología de hibridoma o expresado a partir de una construcción de ADNc.

- 45 **Cantidad terapéuticamente eficaz:** Una cantidad de una sustancia específica suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que se está tratando. Por ejemplo, ésta puede ser la cantidad necesaria para inhibir o suprimir el crecimiento de un tumor. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad necesaria para eliminar, reducir el tamaño, o evitar la metástasis de un tumor. Cuando se administra a un sujeto, generalmente se usará una dosificación que alcanzará las concentraciones de tejido diana (por ejemplo, en tumores) que se ha demostrado que logran un efecto *in vitro* deseado.

- 50 **Toxina:** Una molécula que es citotóxica para una célula. Las toxinas incluyen abrina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE), toxina de la difteria (DT), toxina botulínica, saporina, restrictocina o gelonina, o toxinas modificadas de las mismas. Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que típicamente provocan la muerte a través de la toxicidad hepática. Sin embargo, PE y DT pueden modificarse en una forma para su uso como una inmunotoxina eliminando el componente de direccionamiento nativo de la toxina (tal como el dominio la de PE o la cadena B de DT) y reemplazándolo con un resto de direccionamiento diferente, tal como un anticuerpo.

**Vector:** Una molécula de ácido nucleico que se introduce en una célula huésped, produciendo de este modo una célula huésped transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

5

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. "Que comprende A o B" se refiere a que incluye A, o B, o A y B. Además, debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente descripción, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

10

15

### III. Introducción

Los anticuerpos monoclonales contra la mesotelina se están evaluando actualmente para el tratamiento de mesotelioma y otras formas múltiples de cáncer, y se muestran muy prometedores para el desarrollo clínico de cánceres sólidos. Se ha demostrado que los anticuerpos contra la mesotelina actúan a través de la inhibición del crecimiento tumoral basada en la inmunotoxina y la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Sin embargo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), que se considera uno de los mecanismos de muerte celular más importantes de los anticuerpos terapéuticos contra los tumores, es inactiva para dichos anticuerpos. Se describe en el presente documento el uso de tecnología de modificación de anticuerpos de presentación en fagos y selección de péptidos sintéticos para identificar SD1, un anticuerpo de dominio único humano para la mesotelina de acuerdo con la invención SD1 reconoce un epítipo conformacional en el extremo C-terminal (residuos 539-588 de SEQ ID NO: 9) de mesotelina cerca de la superficie celular. También se identificó SD2, un anticuerpo de dominio único que reconoce mesotelina de longitud completa no según la invención. Para investigar SD1 como un potencial agente terapéutico, se generó una proteína de fusión Fc humana recombinante (SD1-hFc). La proteína SD1-hFc presenta una fuerte actividad de CDC, además de ADCC, contra las células tumorales que expresan mesotelina. Además, la proteína SD1-hFc causa una inhibición significativa del crecimiento tumoral de xenoinjertos tumorales en ratones sin pelo. SD1 es el primer anticuerpo de dominio unido humano dirigido a tumores que expresan mesotelina. Los resultados descritos en el presente documento demuestran que SD1 se puede usar como un agente terapéutico para el cáncer y presenta ventajas significativas sobre la terapia de anticuerpos actual dirigida a tumores que expresan mesotelina.

20

25

30

35

### IV. Anticuerpos monoclonales específicos de mesotelina

Se describen en el presente documento SD1 y SD2, anticuerpos de dominio único humano específicos para mesotelina. A diferencia de los anticuerpos terapéuticos específicos de mesotelina descritos previamente, SD1 reconoce un epítipo conformacional en el extremo C-terminal de la mesotelina. Cuando se fusiona con Fc humano, SD1 provoca fuertes CDC y ADCC contra las células tumorales que expresan mesotelina. También se demuestra en el presente documento que SD1-hFc inhibe significativamente el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer que expresa mesotelina. SD2 reconoce la mesotelina de longitud completa, pero no se une a un fragmento C-terminal de mesotelina. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de SD1 y SD2 se muestran a continuación.

40

45

#### Secuencia de nucleótidos de SD1 (SEQ ID NO: 1):

```
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAC
TCTCCTGTGCAGCCTCTGATTTTCGATTTTCGCTGCTTATGAAATGAGCTGGGTCCGCCAG
GCTCCAGGACAAGGCCCTTGAGTGGGTGGCAATTATATCACATGATGGAATCGATAAAT
ACTACACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACACCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTTTA
AGGCTTGGTGCTGTAGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAAGT
```

50

#### Secuencia de aminoácidos de SD1 (SEQ ID NO: 2):

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASDFDFAAYEMSWVRQAPGQGLEWVAIISHDGDIDKY  
YTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTATYYCLRLGAVGQGLTVVSS

**Tabla 1. Posiciones CDR de SD1 (SEQ ID NO: 2)**

Sistema	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	51-66	99-102
IMGT	26-35	51-58	97-103

**5 Secuencia de nucleótidos de SD2 (SEQ ID NO: 14):**

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAC  
TCTCCTGTGCAGCCTCTGATTTTCGCTTTCGATGATTATGAAATGAGCTGGGTCCGCCAG  
GCTCCAGGAAAGGCCCTTGAGTGGATTGGGGACATCAATCATAGTGGAAACCACCATCT  
ACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCT  
GTATCTGCAAATGAACACCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCATATATTACTGTGCGAGA  
CCTCACTACGGTGACTACTCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAC  
CGTCTCCTCAAGT

**Secuencia de aminoácidos de SD2 (SEQ ID NO: 15):**

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASDFAFDDYEMSWVRQAPGKALEWIGDINHSGTTIYN  
PSLKS RVTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTAIYYCARPHYGDYSDAFDIWGQGTMTVSS  
S

10

**Tabla 2. Posiciones CDR de SD2 (SEQ ID NO: 15)**

Sistema	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	99-106
IMGT	26-33	51-57	96-111

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos monoclonales aislados que se unen (por ejemplo, se unen específicamente) a mesotelina, tal como mesotelina de superficie celular o soluble. En algunas realizaciones, el dominio VH del anticuerpo comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos expuesta en el presente documento como SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 15, tal como una o más (tal como las tres) secuencias CDR de SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 15 según se determina por IMGT. En otras realizaciones, los anticuerpos comprenden una o más (tales como las tres) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 15, según se determina usando el método de Kabat.

20

En algunas realizaciones, el dominio VH del anticuerpo comprende los residuos de aminoácidos 26-35, 51-58 y 97-103 de SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones, el dominio VH del anticuerpo comprende los residuos de aminoácidos 31-35, 51-66 y 99-102 de SEQ ID NO: 2. En algunos ejemplos, el dominio VH del anticuerpo es al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 2. En ejemplos particulares, la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo comprende o consiste en SEQ ID NO: 2.

25

En otras realizaciones, el dominio VH del anticuerpo comprende los residuos de aminoácidos 26-33, 51-57 y 96-111 de SEQ ID NO: 15. En otras realizaciones, el dominio VH del anticuerpo comprende los residuos de aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-106 de SEQ ID NO: 15. En algunos ejemplos, el dominio VH del anticuerpo es al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 15. En ejemplos particulares, la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo comprende o consiste en SEQ ID NO: 15.

30

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal que se une, tal como se une específicamente, a la mesotelina es un anticuerpo de dominio único.

35

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal que se une, tal como se une específicamente, a la mesotelina es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)<sup>2</sup>, un fragmento variable monocatenario (scFv), o un

fragmento variable estabilizado por disulfuro (dsFv). En otras realizaciones, el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina. En ejemplos particulares, el anticuerpo es una IgG.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es quimérico o sintético.

5

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos unen mesotelina (mesotelina soluble o de superficie celular) con una constante de disociación ( $K_d$ ) de aproximadamente 20 nM o menos, tal como aproximadamente 18 nM o menos, 16 nM o menos, 14 nM o menos, 12 nM o menos o 10 nM o menos. En varias realizaciones, los anticuerpos monoclonales se unen a mesotelina con una afinidad de unión de aproximadamente 20 nM, aproximadamente 19

10

nM, aproximadamente 17 nM, aproximadamente 16 nM, aproximadamente 15 nM, aproximadamente 14 nM, aproximadamente 13 nM, aproximadamente 12 nM, aproximadamente 11 nM o aproximadamente 10 nM.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden marcarse, tal como con un marcador fluorescente, enzimático o radiactivo.

15

Se proporcionan también inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento y una molécula efectora. La molécula efectora puede ser, por ejemplo, una toxina o un marcador detectable. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un dominio VH descrito en el presente documento (tal como un dominio VH que comprende las secuencias CDR de SD1 o SD2, o que comprende

20

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 15), y una toxina, tal como PE o una variante, por lo tanto, tal como PE38. En ejemplos particulares, el inmunoconjugado comprende el VH SD1 o SD2 fusionado a PE38. En algunos ejemplos, la toxina es PE38 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Los ejemplos de inmunoconjugados se analizan con mayor detalle en la sección VI a continuación.

25 También se proporcionan proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo descrito en el presente documento y una proteína heteróloga. En algunos ejemplos, la proteína heteróloga es una proteína Fc. En un ejemplo no limitante, la proteína Fc es una proteína Fc humana, tal como Fc IgG<sub>1</sub> humana.

También se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, inmunoconjugado o proteína de fusión descritos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

También se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los anticuerpos monoclonales, inmunoconjugados y proteínas de fusión que se describen. En algunas realizaciones, la

35

secuencia de nucleótidos que codifica el dominio VH del anticuerpo monoclonal comprende al menos una porción de SEQ ID NO: 1, tal como la porción que codifica una o más CDR del anticuerpo. En algunos ejemplos, el dominio VH del anticuerpo monoclonal está codificado por una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio VH del anticuerpo monoclonal comprende al menos una porción de SEQ ID NO: 14, tal como la porción que codifica una o más CDR del anticuerpo. En algunos

40

ejemplos, el dominio VH del anticuerpo monoclonal está codificado por una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 14.

En algunos ejemplos, la molécula de ácido nucleico aislada está unida operativamente a un promotor.

45 También se proporcionan vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en el presente documento. Las células huésped aisladas que comprenden las moléculas o vectores de ácido nucleico también se proporcionan en el presente documento. En algunos ejemplos, la célula huésped es un linfocito T, tal como un linfocito T citotóxico (CTL).

## 50 V. Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden ser de cualquier isotipo. El anticuerpo monoclonal puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgM o IgG, tal como IgG<sub>1</sub> o IgG<sub>2</sub>. La clase de un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina puede cambiarse por otra (por ejemplo, IgG puede cambiarse a IgM), de acuerdo

55

con procedimientos ya conocidos. El cambio de clase también se puede usar para convertir una subclase de IgG en otra, tal como de IgG<sub>1</sub> a IgG<sub>2</sub>.

Los fragmentos de anticuerpos también están incluidos por la presente descripción, tales como anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio VH), Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Estos fragmentos de anticuerpo



conservan la capacidad de unirse selectivamente con el antígeno. Estos fragmentos incluyen:

- 5 (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;
- (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; dos fragmentos Fab' se obtienen por molécula de anticuerpo;
- 10 (3) (Fab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro;
- (4) Fv, un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas;
- 15 (5) Anticuerpo monocatenario (tal como scFv), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unida mediante un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente;
- (6) Un dímero de un anticuerpo monocatenario (scFv)<sub>2</sub>, definido como un dímero de un scFv (también conocido como "minianticuerpo"); y
- 20 (7) anticuerpo de dominio único VH, un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio variable de cadena pesada.

Los métodos para fabricar estos fragmentos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

25 En algunos casos, los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en una célula huésped (tal como *E. coli*) de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse

30 adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que son resultado de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes de 3,5S Fab'. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente (véase la Patente de Estados Unidos N.º 4.036.945 y la Patente de Estados Unidos N.º 4.331.647).

35 Se pueden usar también otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

40 Un experto apreciará que pueden producirse variantes conservativas de los anticuerpos. Dichas variantes conservativas empleadas en fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos dsFv o en fragmentos scFv, retendrán los residuos de aminoácidos críticos necesarios para el plegamiento correcto y la estabilización entre las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, y retendrán las características de carga de los residuos para conservar el bajo pI y la baja toxicidad

45 de las moléculas. Las sustituciones de aminoácidos (tales como, como máximo una, como máximo dos, como máximo tres, como máximo cuatro, o como máximo cinco sustituciones de aminoácidos) pueden hacerse en las regiones V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> para aumentar el rendimiento. Las tablas de sustituciones de aminoácidos conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien por los expertos en la técnica. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí:

- 50 1) Alanina (A), serina (S), treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), lisina (K);
- 55 5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

## VI. Inmunoconjugados y proteínas de fusión

- Los anticuerpos monoclonales descritos específicos para mesotelina pueden conjugarse con un agente terapéutico o molécula efectora. Los inmunoconjugados incluyen, pero sin limitación, moléculas en las que existe un enlace covalente de un agente terapéutico a un anticuerpo. Un agente terapéutico es un agente con una actividad biológica particular dirigida contra una molécula diana particular o una célula que porta una molécula diana. Un experto en la técnica apreciará que los agentes terapéuticos pueden incluir diversos fármacos tales como vinblastina, daunomicina y similares, citotoxinas tales como exotoxina de *Pseudomonas* nativa o modificada o toxina de difteria, agentes encapsulantes (tales como liposomas) que contienen composiciones farmacológicas, agentes radioactivos tales como  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{35}\text{S}$  y otros marcadores, restos diana y ligandos.
- 5
- 10 La elección de un agente terapéutico particular depende de la molécula o célula diana particular, y el efecto biológico deseado. Por lo tanto, por ejemplo, el agente terapéutico puede ser una citotoxina que se usa para provocar la muerte de una célula diana particular (tal como una célula tumoral). Por el contrario, cuando se desea invocar una respuesta biológica no letal, el agente terapéutico se puede conjugar con un agente farmacológico no letal o un liposoma que contiene un agente farmacológico no letal.
- 15
- Con los agentes terapéuticos y anticuerpos descritos en el presente documento, un experto puede construir fácilmente una diversidad de clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en la secuencia pero que codifican el mismo resto efector o secuencia de anticuerpo. Por lo tanto, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y conjugados y proteínas de fusión de los mismos.
- 20
- Las moléculas efectoras se pueden unir a un anticuerpo de interés usando cualquier número de medios conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden usar medios de unión tanto covalentes como no covalentes. El procedimiento para unir una molécula efectora a un anticuerpo varía de acuerdo con la estructura química del efector. Los polipéptidos típicamente contienen una diversidad de grupos funcionales; tales como ácido carboxílico (COOH), grupos amina libres ( $-\text{NH}_2$ ) o sulfhidrilo ( $-\text{SH}$ ), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión de la molécula efectora. Como alternativa, el anticuerpo se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas enlazadoras conocidas. El enlazador puede ser cualquier molécula utilizada para unir el anticuerpo a la molécula efectora. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto para el anticuerpo como para la molécula efectora. Los enlazadores adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclico, o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los enlazadores se pueden unir a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (tal como a través de un enlace disulfuro a cisteína), o a los grupos amino y carboxilo alfa de los aminoácidos terminales.
- 25
- 30
- 35
- En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula efectora del anticuerpo cuando el inmunoconjugado ha alcanzado su sitio diana. Por lo tanto, en estas circunstancias, los inmunoconjugados comprenderán enlaces que son escindibles en las proximidades del sitio diana. La escisión del enlazador para liberar la molécula efectora del anticuerpo puede ser provocada por la actividad enzimática o condiciones a las que se somete el inmunoconjugado, ya sea dentro de la célula diana o en las proximidades del sitio diana.
- 40
- En vista de la gran cantidad de métodos que se han informado para unir una diversidad de compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, fármacos marcadores (tales como enzimas o moléculas fluorescentes), toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la materia será capaz de determinar un método adecuado para unir un agente dado a un anticuerpo u otro polipéptido.
- 45
- Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento pueden derivatizarse o unirse a otra molécula (tal como otro péptido o proteína). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (tal como un dominio VH) se fusiona con una proteína heteróloga, por ejemplo una proteína Fc.
- 50
- En general, los anticuerpos o parte de los mismos, se derivatizan de tal forma que la unión al antígeno diana no se ve afectada adversamente por la derivatización o el marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar funcionalmente unido (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).
- 55

Se produce un tipo de anticuerpo derivatizado mediante reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, tales como para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticuladores adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (tal como éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (tales como suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores están disponibles en el mercado.

Un anticuerpo que se une (por ejemplo, se une específicamente) a mesotelina, o un fragmento de la misma, se puede marcar con un resto detectable. Los agentes de detección útiles incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. Los marcadores bioluminiscentes también son útiles, tal como la luciferasa, la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína amarilla fluorescente (YFP). Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se marca con una enzima detectable, puede detectarse mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede discernirse. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es visualmente detectable. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina y detectarse a través de la medición indirecta de avidina o unión a estreptavidina. Cabe señalar que la propia avidina se puede marcar con una enzima o un marcador fluorescente.

Un anticuerpo puede marcarse con un agente magnético, tal como gadolinio. Los anticuerpos también se pueden marcar con lantánidos (tales como europio y disprosio), y manganeso. Las partículas paramagnéticas tales como el óxido de hierro superparamagnético también se usan como marcadores. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítipo de polipéptido predeterminado reconocido por un indicador secundario (tal como secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítipo). En algunas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Un anticuerpo también se puede marcar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede usarse tanto con fines de diagnóstico como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede usarse para detectar mesotelina mediante rayos X, espectros de emisión u otras técnicas de diagnóstico. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ .

Un anticuerpo también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, tales como aumentar la semivida del suero o aumentar la unión tisular.

Las toxinas pueden emplearse con los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento para producir inmunotoxinas. Las toxinas ejemplares incluyen ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de las mismas, así como toxinas botulínicas de A a F. Estas toxinas están disponibles fácilmente a partir de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Las toxinas contempladas también incluyen variantes de las toxinas descritas en el presente documento (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.079.163 y 4.689.401). En una realización, la toxina es exotoxina de *Pseudomonas* (PE) (Patente de Estados Unidos N.º 5.602.095). Como se usa en el presente documento, "exotoxina de *Pseudomonas*" se refiere a una PE nativa (de origen natural) de longitud completa o una PE que se ha modificado. Dichas modificaciones pueden incluir, pero sin limitación, la eliminación del dominio Ia, diversas deleciones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de un solo aminoácido y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo (por ejemplo, véase Siegall et al., J. Biol. Chem. 264: 14256-14261, 1989).

La PE empleada con los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento puede incluir la secuencia nativa, fragmentos citotóxicos de la secuencia nativa, y variantes conservativamente modificadas de PE nativa y sus fragmentos citotóxicos. Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen aquellos que son citotóxicos con o sin posterior procesamiento proteolítico u otro procesamiento en la célula diana. Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen PE40, PE38 y PE35. Para una descripción adicional de PE y sus variantes, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 4.892.827; 5.512.658; 5.602.095; 5.608.039; 5.821.238; y 5.854.044; Publicación PCT N.º WO 99/51643; Pai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3358-3362, 1991; Kondo et al., J. Biol. Chem. 263: 9470-9475, 1988; Pastan et al., Biochim. Biophys. Acta 1333: C1-C6, 1997.

La secuencia de PE de longitud completa se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 3:

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVSRSSRMSVDPADTNGQGVLHYSMVLEGGNDALKL  
 AIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHEL  
 NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQTQ  
 PRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDI  
 KPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYL  
 AARLSWNQVDQVIRNALASPGSGDLDGEAIREQPEQARLALTLAAEESERFVRQGTGNDE  
 AGAANADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNW  
 VERLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLAQAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALA  
 YGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRL  
 DAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVIPSAPIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYAS  
 QPGKPPREDLK

- 5 En algunos ejemplos, la PE es PE38, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:  
 GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQV  
 IRNALASPGSGDLDGEAIREQPEQARLALTLAAEESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGD  
 ALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLA  
 AQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPR  
 SLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVIPS  
 APIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO: 4)

También se contemplan en el presente documento variantes de PE resistentes a la proteasa y variantes de PE con inmunogenicidad reducida, tales como, pero sin limitación, PE-LR, PE-6X, PE-8X, PE-LR/6X y PE-LR/8X (véanse, por ejemplo, Weldon et al., Blood 113(16): 3792-3800, 2009; Onda et al., Proc Natl Acad Sci USA 105(32): 11311-11316, 2008; y las Publicaciones PCT N.º WO 2007/016150, WO 2009/032954 y WO 2011/032022).

En algunos ejemplos, la PE es una variante que es resistente a la degradación lisosómica, tal como PE-LR (Weldon et al., Blood 113(16): 3792-3800, 2009; Publicación PCT N.º WO 2009/032954) que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

15 RHRQPRGWEQLPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGT  
 FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVY  
 VPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTV  
 VIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO: 5)

En otros ejemplos, la PE es una variante designada PE-LR/6X (Publicación PCT N.º WO 2011/032022) que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

20 RHRQPRGWEQLPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEEGGYVFGYHGT  
 FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWAGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAGRIRNGALLRVY  
 VPRSSLPGFYATSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEESGGRLETILGWPLAERTV  
 VIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDSEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO: 6)

En otros ejemplos, la variante de PE es PE con la reducción de la inmunogenicidad, tal como una PE con la siguiente secuencia:

25 RHRQPRGWEQLPTGAEFLGDGGXVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEEXGYVFGYHGT  
 FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWXGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAXGRIRNGALLRVY  
 VPRSSLPGFYXTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEXGGRLETILGWPLAERTV  
 VIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDXEXAISALPDYASQPGKPPREDLK (X = G, A or S; SEQ ID  
 NO: 7)

En otros ejemplos, la PE es una variante designada PE-LR/8M (Publicación PCT N.º WO 2011/032022) que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

RHRQPRGWEQLPTGAEFLGDGGAVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEEGGYVFGYHGT  
 FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWAGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVY  
 VPRSSLPGFYATSLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEESGGRLETILGWPLAERTV  
 VIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDSEAAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO: 8)

Las sustituciones de PE se definen en el presente documento por referencia a la secuencia de aminoácidos de PE de longitud completa expuesta en el presente documento como SEQ ID NO: 3. Las sustituciones de PE se describen en el presente documento por referencia al residuo de aminoácidos presente en una posición particular, seguido del aminoácido con el cual ese residuo se ha reemplazado en la sustitución particular. A este respecto, las posiciones de la secuencia de aminoácidos de una realización particular de una PE se denominan en el presente documento posiciones de la secuencia de aminoácidos de la realización particular, o las posiciones como se definen por la SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, las sustituciones se refieren a un reemplazo de un residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una realización particular de una PE correspondiente a la posición indicada de la secuencia de 613 aminoácidos de SEQ ID NO: 3, con la comprensión de que las posiciones reales en la secuencia de aminoácidos respectiva pueden ser diferentes. En el caso de múltiples sustituciones en dos o más posiciones, las dos o más sustituciones pueden ser iguales o diferentes: cada residuo de aminoácido de los dos o más residuos de aminoácidos que se sustituyen puede sustituirse con el mismo o diferente residuo de aminoácido, a menos se indique explícitamente de otra manera.

La modificación de PE puede ocurrir en cualquier variante descrita anteriormente, incluyendo fragmentos citotóxicos de PE (por ejemplo, PE38, PE-LR y PE-LR/8M). Las PE modificadas pueden incluir cualquier sustitución, como se ha descrito anteriormente, para uno o más residuos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T y/o epítomos de linfocitos B de PE.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden usarse para dirigir cualquier número de diferentes compuestos de diagnóstico o terapéuticos a células que expresan mesotelina sobre su superficie. Por lo tanto, un anticuerpo de la presente descripción se puede unir directamente, o a través de un enlazador, a un fármaco que se va a administrar directamente a células que expresan mesotelina de superficie celular. Esto se puede hacer con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación. Los agentes terapéuticos incluyen dichos compuestos como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glucoproteínas, radioisótopos, lípidos, carbohidratos o virus recombinantes. Los restos terapéuticos y de diagnóstico de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivatizados para reticulación covalente con ADN simple o dúplex, y oligonucleótidos formadores de tríplex.

Como alternativa, la molécula unida a un anticuerpo antimesotelina puede ser un sistema de encapsulación, tal como un liposoma o micela que contiene una composición terapéutica tal como un fármaco, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido), o otro resto terapéutico que está preferiblemente protegido de la exposición directa al sistema circulatorio. Los medios para preparar liposomas unidos a anticuerpos se conocen bien por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.957.735; Connor et al., Pharm. Ther. 28: 341-365, 1985).

Los anticuerpos descritos en el presente documento también se pueden unir de forma covalente o no covalente a un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados para tal uso incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles incluyen perlas magnéticas, tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína verde fluorescente, y similares), radiomarcadores (por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , o  $^{32}\text{P}$ ), enzimas (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (tales como poliestireno, polipropileno, látex y similares).

Los medios para detectar tales marcadores se conocen bien por los expertos en la técnica. De este modo, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse usando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

## 55 VII. Composiciones y métodos de uso

Se proporcionan composiciones que incluyen uno o más de los anticuerpos descritos que se unen (por ejemplo, se unen específicamente) a mesotelina en un vehículo. También se proporcionan composiciones que comprenden proteínas de fusión, inmunoconjugados o inmunotoxinas. Las composiciones se pueden preparar en formas de dosificación unitaria para su administración a un sujeto. La cantidad y el tiempo de la administración quedan a discreción del médico tratante para lograr el resultado deseado. El anticuerpo puede formularse para administración sistémica o local (tal como intratumoral). En un ejemplo, el anticuerpo se formula para administración parenteral, tal como administración intravenosa.

10 Las composiciones para administración pueden incluir una solución del anticuerpo disuelta en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Se puede usar una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente no contienen materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales y bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera, para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente en base a los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del sujeto.

20 Una composición farmacéutica típica para administración intravenosa incluye aproximadamente de 0,1 a 10 mg de anticuerpo por sujeto al día. Se pueden usar dosis de 0,1 hasta aproximadamente 100 mg por sujeto al día, particularmente si el agente se administra en un sitio aislado y no en el sistema circulatorio o linfático, tal como en una cavidad corporal o en un lumen de un órgano. Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995).

Los anticuerpos pueden proporcionarse de forma liofilizada y rehidratarse con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en soluciones estériles de concentración conocida. La solución de anticuerpo se añade entonces a una bolsa de infusión que contiene cloruro de sodio al 0,9%, USP, y en algunos casos se administra a una dosis de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal. Se dispone de una experiencia considerable en la técnica en la administración de fármacos de anticuerpos, que se han comercializado en Estados Unidos desde la aprobación de RITUXAN® en 1997. Los anticuerpos se pueden administrar por infusión lenta, en lugar de por empuje intravenoso o bolo. En un ejemplo, se administra una dosis de carga mayor, administrándose dosis de mantenimiento posteriores a un nivel inferior. Por ejemplo, se puede infundir una dosis de carga inicial de 4 mg/kg durante un período de aproximadamente 90 minutos, seguido de dosis de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidos durante un período de 30 minutos si la dosis anterior se toleró bien.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada se pueden hacer como implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas particulados. Para una descripción general de los sistemas de administración de proteínas, véase Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, como núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas menores de aproximadamente 1 µm se denominan generalmente nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, de manera que solamente las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Las micropartículas tienen típicamente aproximadamente 100 µm de diámetro 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); y Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, págs. 315-339 (1992).

Los polímeros se pueden usar para la liberación controlada por iones de las composiciones de anticuerpos descritas en el presente documento. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en la administración controlada de fármacos (Langer, Accounts Chem. Res. 26: 537-542, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloques, polaxamer 407, existe como un líquido viscoso pero móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y administración sostenida de interleucina-2 recombinante y ureasa (Johnston et al., Pharm. Res. 9: 425-434, 1992; y Pec et al., J. Parent. Sci. Tech. 44(2): 58-65, 1990). Como alternativa, se ha usado hidroxipatito como

un microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., Int. J. Pharm.112: 215-224, 1994). En otro aspecto más, los liposomas se usan para la liberación controlada, así como para el direccionamiento del fármaco del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas (véanse la Patente de Estados Unidos N.º 5.055.303; Patente de Estados Unidos N.º 5.188.837; Patente de Estados Unidos N.º 4.235.871; Patente de Estados Unidos N.º 4.501.728; Patente de Estados Unidos N.º 4.837.028; Patente de Estados Unidos N.º 4.957.735; Patente de Estados Unidos N.º 5.019.369; Patente de Estados Unidos N.º 5.055.303; Patente de Estados Unidos N.º 5.514.670; Patente de Estados Unidos N.º 5.413.797; Patente de Estados Unidos N.º 5.268.164; Patente de Estados Unidos N.º 5.004.697; Patente de Estados Unidos N.º 4.902.505; Patente de Estados Unidos N.º 5.506.206; Patente de Estados Unidos N.º 5.271.961; Patente de Estados Unidos N.º 5.254.342 y la Patente de Estados Unidos N.º 5.534.496).

#### A. Métodos terapéuticos

15 Los anticuerpos, composiciones, proteínas de fusión e inmunoconjugados descritos en el presente documento pueden administrarse para ralentizar o inhibir el crecimiento de células tumorales o inhibir la metástasis de células tumorales, tales como mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (tal como cáncer de mama triple negativo) o cáncer de ovario. En estas aplicaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo a un sujeto en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento, la replicación o la metástasis de células cancerosas, o para inhibir un signo o un síntoma del cáncer. Los sujetos adecuados pueden incluir a aquellos diagnosticados con un cáncer que expresa mesotelina, tales como, pero sin limitación, mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama nativo triple o cáncer de ovario.

20 En una realización no limitante, se proporciona en el presente documento un método para tratar un sujeto con cáncer seleccionando un sujeto que tiene un cáncer que expresa mesotelina y administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, composición, proteína de fusión o inmunoconjugado descrito en el presente documento.

25 También se proporciona en la presente un método para inhibir el crecimiento tumoral o metástasis seleccionando un sujeto que tiene un cáncer que expresa mesotelina y administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, composición, proteína de fusión o inmunoconjugado que se describe en el presente documento.

30 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo específico de mesotelina, proteína de fusión, composición o inmunoconjugado dependerá de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo es la que proporciona un alivio subjetivo de uno o más síntomas o una mejora objetivamente identificable según lo observado por el médico u otro observador cualificado.

35 La administración de los anticuerpos, proteínas de fusión e inmunoconjugados (o composiciones de los mismos) que se describen en el presente documento también puede ir acompañada de la administración de otros agentes anticancerosos o tratamientos terapéuticos (tales como la resección quirúrgica de un tumor). Se puede administrar cualquier agente anticanceroso adecuado en combinación con los anticuerpos, composiciones, proteínas de fusión e inmunoconjugados descritos en el presente documento. Los agentes anticancerosos ejemplares incluyen, pero sin limitación, agentes quimioterapéuticos, tales como, por ejemplo, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de la topoisomerasa, agentes antiproliferación, modificadores de la respuesta biológica, agentes antihormonas (por ejemplo, antiandrógenos) y agentes antiangiogénesis. Otros tratamientos contra el cáncer incluyen la radioterapia y otros anticuerpos que se dirigen específicamente a las células cancerosas.

40 Los ejemplos no limitantes de agentes alquilantes incluyen mostazas nitrogenadas (tales como mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, mostaza de uracilo o clorambucilo), sulfonatos de alquilo (tales como busulfán), nitrosoureas (tales como carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina o dacarbazina).

45 Los ejemplos no limitantes de antimetabolitos incluyen análogos de ácido fólico (tales como metotrexato), análogos de pirimidina (tales como 5-FU o citarabina) y análogos de purina, tales como mercaptopurina o tioguanina.

50 Los ejemplos no limitantes de productos naturales incluyen alcaloides de la vinca (tales como vinblastina, vincristina o vindesina), epipodofilotoxinas (tales como etopósido o tenipósido), antibióticos (tales como dactinomicina,

daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina o mitomicina C), y enzimas (tal como L-asparaginasa).

Los ejemplos no limitantes de agentes misceláneos incluyen complejos de coordinación de platino (tales como cis-diamina-dicloroplatino II también conocido como cisplatino), ureas sustituidas (tal como hidroxiiurea), derivados de metilhidrazina (tal como procarbazona), y supresores corticosuprarrenales (tales como mitotano y aminoglutetimida).

Los ejemplos no limitantes de hormonas y antagonistas incluyen adrenocorticosteroides (tal como prednisona), progestinas (tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de magestrol), estrógenos (tales como dietilestilbestrol y etinil estradiol), antiestrógenos (tal como tamoxifeno), y andrógenos (tales como propionato de testosterona y fluoximesterona). Los ejemplos de los fármacos quimioterapéuticos usados más comúnmente incluyen Adriamicina, Alkeran, Ara-C, BiCNU, Busulfán, CCNU, Carboplatino, Cisplatino, Citoxano, Daunorrubicina, DTIC, 5-FU, Fludarabina, Hydrea, Idarrubicina, Ifosfamida, Metotrexato, Mitramicina, Mitomicina, Mitoxantrona, mostaza nitrogenada, Taxol (u otros taxanos, tal como docetaxel), Velban, Vincristina, VP-16, mientras que algunos fármacos más nuevos incluyen gemcitabina (Gemzar), herceptina, irinotecán (Camptosar, CPT-11), Leustatina, Navelbina, Rituxan STI-571, Taxotere, Topotecán (Hycamtin), Xeloda (Capecitabina), Zevelin y calcitriol.

Los ejemplo no limitantes de inmunomoduladores que pueden usarse incluyen AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; Genetics Institute), IL-2 (Cetus o Hoffman-LaRoche), inmunoglobulina humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg of New Orleans, La.), SK&F 106528 y TNF (factor de necrosis tumoral; Genentech). Otro tratamiento común para algunos tipos de cáncer es el tratamiento quirúrgico, por ejemplo, la resección quirúrgica del cáncer o una porción del mismo. Otro ejemplo de tratamiento es la radioterapia, por ejemplo, la administración de material radiactivo o energía (tal como terapia de haz externo) al sitio del tumor para ayudar a erradicar el tumor o reducirlo antes de la resección quirúrgica.

## B. Métodos para diagnóstico y detección

Se proporcionan en el presente documento métodos para detectar la expresión de mesotelina *in vitro* o *in vivo*. En algunos casos, la expresión de mesotelina se detecta en una muestra biológica. La muestra puede ser cualquier muestra, incluyendo, pero sin limitación, tejido de biopsias, autopsias y muestras de patología. Las muestras biológicas también incluyen secciones de tejidos, por ejemplo, secciones congeladas tomadas con fines histológicos. Las muestras biológicas incluyen además fluidos corporales, tales como sangre, suero, plasma, esputo, líquido cefalorraquídeo u orina. Una muestra biológica se obtiene típicamente de un mamífero, tal como un primate humano o no humano.

En una realización, se proporciona un método para determinar si un sujeto tiene cáncer al poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento; y detectar la unión del anticuerpo a la muestra. Un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del anticuerpo a una muestra de control identifica que el sujeto tiene cáncer.

En otra realización, se proporciona un método para confirmar un diagnóstico de cáncer en un sujeto poniendo en contacto una muestra de un sujeto diagnosticado con cáncer con un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento; y detectar la unión del anticuerpo a la muestra. Un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del anticuerpo a una muestra de control confirma el diagnóstico de cáncer en el sujeto.

En algunos ejemplos de los métodos descritos, el anticuerpo monoclonal está marcado directamente.

En algunos ejemplos, los métodos incluyen además poner en contacto un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo monoclonal con la muestra; y detectar la unión del segundo anticuerpo. Un aumento en la unión del segundo anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del segundo anticuerpo a una muestra de control detecta el cáncer en el sujeto o confirma el diagnóstico de cáncer en el sujeto.

En algunos casos, el cáncer es mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama triple negativo o cáncer de ovario, o cualquier otro tipo de cáncer que exprese mesotelina.

En algunos ejemplos, la muestra de control es una muestra de un sujeto sin cáncer. En ejemplos particulares, la muestra es una muestra de sangre o tejido.



- En algunos casos, el anticuerpo que se une (por ejemplo, se une específicamente) a la mesotelina se marca directamente con un marcador detectable. En otra realización, el anticuerpo que se une (por ejemplo, se une específicamente) a la mesotelina (el primer anticuerpo) no está marcado y se marca un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina. Como se conoce bien por los expertos en la técnica, se elige un segundo anticuerpo que sea capaz de unirse específicamente a la especie específica y la clase del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el primer anticuerpo es una IgG humana, entonces el anticuerpo secundario puede ser una IgG antihumano. Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen, sin limitación, Proteína A y Proteína G, ambas de las cuales están disponibles comercialmente.
- 10 Los marcadores adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario se describen anteriormente, e incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes magnéticos y materiales radiactivos. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Los ejemplos no limitantes de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos no limitantes de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un material luminiscente ilustrativo no limitativo es luminol; un agente magnético ejemplar no limitativo es gadolinio, y los marcadores radiactivos ejemplares no limitantes incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .
- 15 20 En una realización alternativa, la mesotelina puede ensayarse en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición que utiliza patrones de mesotelina marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo no marcado que se une específicamente a la mesotelina. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de mesotelina marcados y el anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina se combinan y se determina la cantidad de patrón de mesotelina marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de mesotelina en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de mesotelina marcado unido al anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina.
- Los inmunoensayos y el método descritos en el presente documento se pueden usar para varios propósitos. En una realización, el anticuerpo que se une específicamente a mesotelina puede usarse para detectar la producción de mesotelina en células en cultivo celular. En otra realización, el anticuerpo puede usarse para detectar la cantidad de mesotelina en una muestra biológica, tal como una muestra de tejido, o una muestra de sangre o suero. En algunos ejemplos, la mesotelina es mesotelina de superficie celular. En otros ejemplos, la mesotelina es mesotelina soluble (por ejemplo, mesotelina en un sobrenadante de cultivo celular o mesotelina soluble en una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de sangre o suero).
- 30 35 En una realización, se proporciona un kit para detectar mesotelina en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre o muestra de tejido. Por ejemplo, para confirmar un diagnóstico de cáncer en un sujeto, se puede realizar una biopsia para obtener una muestra de tejido para el examen histológico. Como alternativa, se puede obtener una muestra de sangre para detectar la presencia de proteína o fragmento de mesotelina soluble. Los kits para detectar un polipéptido típicamente comprenderán un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a mesotelina, tal como cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, se incluye en el kit un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento scFv, un dominio VH o un Fab. En una realización adicional, el anticuerpo está marcado (por ejemplo, con una etiqueta fluorescente, radioactiva o enzimática).
- 40 45 En una realización, un kit incluye materiales de instrucción que describen los medios de uso de un anticuerpo que se une a mesotelina. Los materiales de instrucción pueden estar escritos, en forma electrónica (como un disquete informático o un disco compacto) o pueden ser visuales (tales como archivos de vídeo). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que está diseñado el kit. Por lo tanto, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios para detectar una etiqueta (tales como sustratos enzimáticos para marcadores enzimáticos, conjuntos de filtros para detectar marcadores fluorescentes, marcadores secundarios apropiados, tales como un anticuerpo secundario, o similares). Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos usados rutinariamente para la práctica de un método particular. Dichos kits y contenidos apropiados se conocen bien por los expertos en la técnica.
- 50 55 En una realización, el kit de diagnóstico comprende un inmunoensayo. Aunque los detalles de los inmunoensayos pueden variar con el formato particular empleado, el método para detectar mesotelina en una muestra biológica generalmente incluye las etapas de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que reacciona específicamente, bajo condiciones inmunológicamente reactivas, a un polipéptido mesotelina. Se permite que el anticuerpo se una específicamente en condiciones inmunológicamente reactivas para formar un complejo inmune, y

la presencia del complejo inmune (anticuerpo unido) se detecta directa o indirectamente.

Los métodos para determinar la presencia o ausencia de un marcador de superficie celular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden conjugarse con otros compuestos que incluyen, pero sin limitación, 5 enzimas, perlas magnéticas, perlas magnéticas coloidales, haptenos, fluorocromos, compuestos metálicos, compuestos radiactivos o fármacos. Los anticuerpos también se pueden utilizar en inmunoensayos tales como, pero sin limitación, radioinmunoensayos (RIA), ELISA o ensayos inmunohistoquímicos. Los anticuerpos también se pueden usar para la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). FACS emplea una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz obtusa y de ángulo bajo, y canales de impedancia, entre otros 10 niveles de detección más sofisticados, para separar o clasificar células (véase la patente de Estados Unidos N.º 5.061.620). Cualquiera de los anticuerpos monoclonales que se unen a la mesotelina, como se describe en el presente documento, puede usarse en estos ensayos. Por lo tanto, los anticuerpos pueden usarse en un inmunoensayo convencional, que incluye, sin limitación, un ELISA, un RIA, FACS, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia de Western o inmunoprecipitación.

15

### C. Linfocitos T citotóxicos modificados (CTL)

Los anticuerpos monoclonales descritos también pueden usarse para producir CTL modificados para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR, también conocidos como receptores de linfocitos T quiméricos, 20 receptores de linfocitos T artificiales o inmunorreceptores quiméricos). Generalmente, los CAR incluyen un resto de unión, una bisagra extracelular y un elemento espaciador, una región transmembrana y un endodominio que realiza funciones de señalización (Cartellieri et al., J Biomed Biotechnol 2010: 956304, 2010). En muchos casos, el resto de unión es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal, tal como un scFv. Se han usado varios endodominios diferentes para generar CAR. Por ejemplo, el endodominio puede consistir en una cadena de 25 señalización que tiene un motivo de activación basado en inmunorreceptor de tirosina (ITAM), tal como CD3 $\zeta$  o Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ . En algunos casos, el endodominio incluye además la porción intracelular de al menos un dominio coestimulador adicional, tal como CD28 y/o CD137.

Los CTL que expresan CAR pueden usarse para dirigirse a un tipo de célula específico, tal como una célula tumoral. 30 Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento se pueden usar para modificar CTL que expresan un CAR que contiene un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo específico de mesotelina, dirigiendo de este modo los CTL modificados a las células tumorales de expresión de mesotelina. Los linfocitos T diseñados previamente se han usado para la terapia adoptiva para algunos tipos de cáncer (véase, por ejemplo, Park et al., Mol Ther 15(4): 825-833, 2007). El uso de linfocitos T que expresan CAR es más universal que la 35 inmunoterapia estándar basada en CTL porque los CTL que expresan CAR son HLA sin restringir y, por lo tanto, pueden usarse para cualquier paciente que tenga un tumor que exprese el antígeno diana.

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan CAR que comprenden un fragmento de unión a anticuerpo específico de mesotelina, tal como un scFv. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico 40 aisladas y vectores que codifican los CAR, y células huésped, tales como CTL, que comprenden las moléculas o vectores de ácido nucleico. Los CTL que expresan CAR compuestos por un fragmento de unión de anticuerpo específico de mesotelina pueden usarse para el tratamiento de cánceres que expresan mesotelina, tales como mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (tales como cáncer de mama triple negativo) o cáncer de ovario. 45 Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar un sujeto con cáncer seleccionando un sujeto que tiene un cáncer que expresa mesotelina, y administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los CTL que expresan los CAR dirigidos a mesotelina.

### D. Anticuerpos biespecíficos

50

Los anticuerpos biespecíficos son proteínas recombinantes que comprenden fragmentos de unión a antígeno de dos anticuerpos monoclonales diferentes. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos se unen a dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para la inmunoterapia contra el cáncer dirigiéndose simultáneamente tanto a los CTL (tales como un componente del receptor CTL tal como CD3) como a un antígeno tumoral. Los 55 anticuerpos monoclonales específicos de mesotelina descritos en el presente documento pueden usarse para generar anticuerpos biespecíficos que se dirigen tanto a mesotelina como a CTL, proporcionando de este modo un medio para tratar cánceres que expresan mesotelina.

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos monoclonales biespecíficos que comprenden un anticuerpo

monoclonal específico de mesotelina, o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal biespecífico comprende además un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un componente del receptor de linfocitos T, tal como CD3. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas y vectores que codifican los anticuerpos biespecíficos, y células huésped que comprenden las moléculas o vectores de ácido nucleico. Los anticuerpos biespecíficos que comprenden un anticuerpo específico de mesotelina, o fragmento de unión a antígeno del mismo, pueden usarse para el tratamiento de cánceres que expresan mesotelina, tales como mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (tal como cáncer de mama triple negativo) o cáncer de ovario. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar un sujeto con cáncer seleccionando un sujeto que tiene un cáncer que expresa mesotelina, y administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico dirigido a mesotelina.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o realizaciones particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la descripción a las características o realizaciones particulares descritas. La invención se define en las reivindicaciones.

## Ejemplos

### 20 Ejemplo 1: Materiales y métodos

Este ejemplo describe los procedimientos experimentales para los estudios descritos en el Ejemplo 2.

#### Cultivo celular

Se cultivaron líneas de colangiocarcinoma humano (CCA) (KMBC, Mz-ChA-1 y HuCCT-1) y células A431 (carcinoma epidérmico), NCI-H226 (mesotelioma), EK VX (cáncer de pulmón de células no pequeñas humano, o NSCLC), OVCAR-8 (cáncer de ovario) y L55 (NSCLC) como se describe (Ho et al., Int J Cancer 128: 2020-2030, 2011; Yu et al., J Cancer 1: 141-149, 2010). A431/H9 es una línea celular A431 transfectada que expresa de forma estable mesotelina humana (Ho et al., Clin Cancer Res 11: 3814-3820, 2005). La línea celular HEK-293F (Invitrogen, Carlsbad, CA) se cultivó en medio libre de suero FreeStyle™ (Invitrogen). Todas las líneas celulares se pasaron solo unas pocas veces (menos de 1 mes) después de la descongelación de las reservas congeladas iniciales, que se generaron inmediatamente después de obtener las líneas celulares, para reducir el número total de pases a menos de 15. Todas las líneas celulares se ensayaron y se autenticaron por morfología y tasa de crecimiento y estaban libres de *Mycoplasma*.

#### Cribado de una biblioteca de dominio de anticuerpos humanos modificada

Una biblioteca de dominios de anticuerpos humanos (VH) modificada denominada m81 mostró una diversidad estimada de  $2,5 \times 10^{10}$  (Chen et al., J Mol Biol 382: 779-789, 2008). El péptido de mesotelina C-terminal que consiste en 50 aminoácidos (VQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLV; residuos 539-588 de SEQ ID NO: 9) se sintetizó (GenScript, Piscataway, NJ). La proteína de mesotelina humana de longitud completa (MSLN) se preparó como se describe (Kaneko et al., J Biol Chem 284: 3739-3749, 2009). La biblioteca de fagos se sometió a cuatro rondas de inmunopurificación en la mesotelina humana o el péptido mesotelina C-terminal siguiendo un protocolo de laboratorio estándar (Ho et al., J Biol Chem 280: 607-617, 2005; Ho y Pastan, Methods Mol Biol 525: 293-308, 2009). Los clones elegidos al azar al final de cada ronda de inmunopurificación se analizaron para determinar la unión al antígeno mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas de fagos (ELISA).

#### Producción de una proteína de fusión SD1-Fc humana

La región VH que codifica el dominio de anticuerpo humano SD1 fusionado con Fc IgGy1 humana y la etiqueta FLAG/His se amplificó por PCR con dos cebadores (Directo: GTC ATC ACA ACT TCG ATA TCG CGG TGC AGC GGT GCA GTC TGG GGG AGG CTT GGT A; SEQ ID NO: 10; inverso: GAA GTT GTG ATG ACT CCG GAG CCC TTA TCG TCA TCG TCC TTG TAG TCG CCG TGG; SEQ ID NO: 11). El producto de PCR se insertó en los sitios EcoRV y BspEI (subrayado) del vector, pVRC8400 (Barouch et al., J Virol 79: 8828-8834, 2005; Ofek et al., J Virol 84: 2955-2962, 2010). El plásmido final (denominado pMH148) se transfectó en células HEK-293F y la proteína se purificó utilizando una columna de proteína A (GE healthcare, Piscataway, NJ). Se estableció una línea celular estable mediante la transfección de células HEK-293F (Invitrogen) con pMH148. La línea estable produjo la proteína de fusión SD1-hFc con un alto nivel de expresión (>70 mg/l) en el sobrenadante de cultivo.

**Inmunoprecipitación y análisis de transferencia western**

Se incubó un lisado celular (1,5 mg) con 50 µg de SD1 o un anticuerpo de dominio único irrelevante en 500 µl de tampón RIPA (Cell signaling, Boston, MA) y se hizo girar durante una noche a 4 °C. Se añadieron treinta µl de perlas de proteína A (Sigma, St. Louis, MO) y se hicieron girar a 4 °C durante 2 horas. Las perlas se centrifugaron y se lavaron con tampón RIPA. Los complejos inmunes se liberaron de las perlas después de 5 minutos de ebullición en 100 µl de tampón de carga 2x. El análisis de transferencia Western se realizó siguiendo un protocolo de laboratorio estándar (Yu et al., J Cancer 1: 141-149, 2010).

10

**ELISA**

Medición de ELISA directo y de la afinidad - La unión directa y la afinidad de SD1-hFc se evaluaron en las placas de ELISA recubiertas con péptido mesotelina, mesotelina humana, o mesotelina de ratón (mMSLN) siguiendo los procedimientos descritos anteriormente (Kaneko et al., J Biol Chem 284: 3739-3749, 2009).

15

ELISA de competición - Se mezclaron diversas cantidades de péptido mesotelina, un péptido irrelevante de 50 aminoácidos, el mAb humano HN1 o la inmunotoxina SS1P con 5 µg/ml de SD1-hFc y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la mezcla se transfirió a una placa ELISA recubierta con 5 µg/ml de proteína mesotelina humana y se incubó a temperatura ambiente durante una hora más siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

20

**Citometría de flujo**

Para determinar la unión del anticuerpo SD1 a la mesotelina asociada a la superficie celular, se realizó un análisis de citometría de flujo de acuerdo con un protocolo estándar (Yu et al., J Cancer 1: 141-149, 2010). El número promedio de sitios de mesotelina por célula se midió en un FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) usando perlas de PE BD Quantibrite™ (BD Biosciences).

Los ensayos de unión a C1q y antimesotelina se realizaron siguiendo un protocolo establecido (Pawluczko-wycz et al., J Immunol 183: 749-758, 2009; Li et al., Cancer Res 68: 2400-2408, 2008). Brevemente, las células A431/H9 o NCI-H226 se suspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml y se incubaron con diferentes concentraciones de SD1-hFc, IgG humana de control o la IgG humana HN1 en hielo durante 1 hora. Después del lavado, las células se incubaron con 20 µg/ml de C1q purificado (Complement Technologies, Tyler, TN) a 37 °C durante 0,5 horas. Las células se lavaron de nuevo y luego se incubaron con mAb C1q de oveja antihumano marcado con FITC (AbD Serotec, Raleigh, NC) durante 0,5 horas en hielo. Al final de la incubación, las células se lavaron y se analizaron usando un FACSCalibur.

35

**ADCC y CDC**

El ensayo de ADCC se realizó usando un kit de detección de LDH (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con un protocolo estándar (Ho et al., Int J Cancer 128: 2020-2030, 2011). La actividad CDC de SD1-hFc también se midió mediante ensayo de liberación de LDH. Brevemente, las células se incubaron con SD1-hFc durante 1 hora en medio de cultivo DMEM en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C seguido de la adición de suero humano normal (20% vol/vol) o suero de ratón recién extraído (30% vol/vol) como fuente de complemento. Los sueros humanos normales se proporcionaron por el Department of Transfusion Medicine, NIH Clinical Center (Bethesda, MD). Después de una incubación adicional durante 4 horas a 37 °C, la lisis celular se determinó midiendo la cantidad de LDH liberada en el sobrenadante del cultivo. La liberación máxima de LDH se determinó por lisis en Triton X-100 al 1%. El porcentaje de lisis específica se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: % de lisis = [(liberación experimental-liberación espontánea)/(liberación máxima-liberación espontánea)] x 100.

45

**50 Pruebas antitumorales de xenoinjerto en ratones**

Se realizaron experimentos tumorales que evaluaban SD1-hFc usando xenoinjertos A431/H9 en ratones sin pelo siguiendo un protocolo de NCI ya establecido (Hassan et al., Cancer Immun 7: 20, 2007). Ratones sin pelo hembra de cuatro a seis semanas de edad se alojaron en jaulas de microaislamiento durante el transcurso del experimento. Se inocularon tres millones de células A431/H9 por vía subcutánea en el costado derecho de los ratones. Las dimensiones del tumor se determinaron usando calibradores y el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) se calculó mediante la fórmula: longitud x (ancho)<sup>2</sup> x 0,5. El tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 70 mm<sup>3</sup> de tamaño. Los diferentes regímenes de tratamiento incluían: PBS y SD1-hFc (50 mg/kg) a través de inyección i.v. los días 7, 9, 11, 14, 17, 20 después de la inoculación del tumor. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores

55

alcanzaron más de 1000 mm<sup>3</sup>.

#### Producción de una inmunotoxina recombinante

- 5 El dominio de anticuerpo SD1 de fagémidos seleccionados se amplificó por PCR usando dos cebadores (directo: GTC ATC ACA ACT TCC ATA TGC AGG TGC AGC TGG TGC AGT CT, SEQ ID NO: 12; e inverso: GAA GTT GTG ATG ACA AGC TTT GGC CGC ACT TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TC; SEQ ID NO: 13) que introdujo los sitios de restricción *Nde*I y *Hind*-III (subrayados). Los productos de la reacción se clonaron en pRB98. El plásmido de expresión final (denominado pMH149) se usó para la producción de inmunotoxinas recombinantes como se ha descrito previamente (Pastan y Ho, "Recombinant immunotoxins for Treating Cancer", en *Antibody Engineering*, Volume II, Nueva York: Springer; 2010, páginas 127-146).

#### Ensayo de inhibición de la proliferación celular

- 15 Se midió la inhibición del crecimiento celular mediante ensayos WST-8 como se ha descrito previamente (Ho et al., *Int J Cancer* 128: 2020-2302, 2011; Ho et al., *J Biol Chem* 280: 607-617, 2005).

#### Ejemplo 2: Un anticuerpo de dominio único humano provoca una potente actividad antitumoral dirigiéndose a un epítipo en la mesotelina cerca de la superficie de la célula cancerosa

- 20 Este ejemplo describe la identificación y caracterización de un anticuerpo de dominio único humano específico para un epítipo C-terminal de mesotelina humana.

#### Descubrimiento y producción del anticuerpo humano SD1

- 25 Para encontrar un nuevo mAb antimesotelina dirigido a un sitio cercano a la superficie celular, se diseñó un péptido mesotelina C-terminal para explorar una biblioteca de aglutinantes de pequeño tamaño (VH). El gen de la mesotelina humana (MSLN) codifica una proteína precursora de 622 aminoácidos (número de acceso de GenBank AY743922). Tras la translocación al retículo endoplásmico, el péptido señal N-terminal (residuos: 1-33) y la señal de adición del anclaje GPI C-terminal (sitio de escisión predicho: Ser598) se eliminan y el último se reemplaza con un anclaje GPI. Utilizando el programa big-PI Predictor, el sitio de división de GPI se predijo como Ser598. Inicialmente, la intención era preparar un péptido de 50 aminoácidos (residuos 549-598) correspondiente al extremo C-terminal predicho, sin embargo, la síntesis falló después de problemas de agregación posiblemente debido a la propiedad hidrófoba del péptido. Se diseñó un nuevo péptido (restos 539-588 de SEQ ID NO: 9; 35 VQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLV), a 10 aminoácidos del sitio de escisión de GPI de la mesotelina (Figura 1A). El nuevo péptido se usó para la inmunopurificación de fagos con una biblioteca de presentación en fagos de dominio de anticuerpo humano modificada (Chen et al., *J Mol Biol* 382: 779-789, 2008) (Table 1).
- 40 Después de la cuarta ronda de inmunoprecipitación de fagos, el título de fagos aumentó significativamente (Figura 1B) y más del 95% de los clones fueron aglutinantes de péptidos. El clon del fago SD1 se seleccionó para un análisis adicional porque se unía no solo al péptido, sino también a la mesotelina de longitud completa (Figura 1C). En comparación, la misma biblioteca de fagos de anticuerpos de dominio único se cribó en mesotelina humana, pero solo el clon SD2 estaba enriquecido y era específico para la mesotelina humana de longitud completa, pero no para el péptido (Figura 1D). Parece poco probable obtener mAbs que reconozcan el extremo C-terminal de la mesotelina si se criban con proteínas de longitud completa mediante hibridoma (Onda et al., *Clin Cancer Res* 11: 5840-5846, 2005), o tecnología de presentación en fagos.

Tabla 1. Inmunopurificación de fagos

Ronda	Entrada de fagos (ufp)	Salida de fagos (ufp)	Enriquecimiento (veces, salida de fagos en comparación con la última ronda)	Enriquecimiento total (veces, salida de fagos en comparación con la 1ª ronda)
1	3,6 x 10 <sup>11</sup>	9,8 x 10 <sup>4</sup>		1
2	2,4 x 10 <sup>11</sup>	2,6 x 10 <sup>4</sup>	0,3	0,3
3	2,0 x 10 <sup>11</sup>	2,4 x 10 <sup>6</sup>	92	24
4	3,0 x 10 <sup>11</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>	58	1429

- 50 El título del fago después de cada ronda de inmunopurificación se mostró como unidades formadoras de placa (ufp).

Para investigar SD1 como un producto terapéutico potencial, se convirtió en una molécula clínicamente relevante:

una proteína de fusión Fc humana (hFc) (Figura 2A). La proteína humana SD1-hFc se generó fusionando la VH humana en CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> en la región constante de la cadena pesada de IgG humana  $\gamma$ 1. Para producir a gran escala la proteína de fusión SD1-hFc, se estableció una línea celular estable con un alto nivel de expresión (>70 mg/l) en el sobrenadante de cultivo de células HEK-293F. SD1-hFc es una molécula dimérica de tipo anticuerpo (sin la cadena ligera) y tiene aproximadamente 100 kDa estimados en SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Por lo tanto, el dominio de anticuerpo humano SD1 se aisló con éxito contra el extremo C-terminal de la mesotelina mediante presentación en fagos, y se produjo una fusión Fc humana (SD1-hFc) basada en SD1 VH para posibles aplicaciones clínicas.

## 10 El anticuerpo humano SD1 se une a la mesotelina asociada a la superficie de las células cancerosas

Para analizar las propiedades de unión del anticuerpo SD1 a la proteína mesotelina en células cancerosas, se usó SD1-hFc o una proteína de fusión hFc de dominio único VH irrelevante como control para realizar ensayos de transferencia Western y de precipitación usando lisados de células cancerosas. El análisis de transferencia Western inicial de diversos lisados celulares de cáncer usando SD1-hFc no pudo detectar una banda de mesotelina en condiciones reductoras ni siquiera en líneas celulares de alta expresión de mesotelina tales como A431/H9 y NCI-H226, indicando que SD1-hFc no reconocía la proteína mesotelina desnaturalizada. Realizando ensayos de precipitación para detectar proteínas mesotelina endógenas en solución, como se muestra en la Figura 2B, la proteína SD1-hFc precipitó con éxito la proteína mesotelina madura de tres líneas celulares de cáncer diferentes (A431/H9, NCI-H226 y KMBC). NCI-H226 y KMBC son líneas celulares de cáncer humano nativas. A431/H9 era una línea A431 modificada que sobreexpresaba mesotelina en la superficie celular (Ho et al., Clin Cancer Res 11: 3814-3820, 2005). El peso molecular de la mesotelina madura (~40 kDa) fue consistente con estudios previos (Yu et al., J Cancer 1: 141-149, 2010; Ho et al., Clin Cancer Res 13: 1571-1575, 2007). En los ensayos ELISA, la proteína SD1-hFc se unió tanto a la proteína mesotelina humana de longitud completa como al péptido mesotelina (Figura 3A), y no se unió a la proteína de mesotelina de ratón de longitud completa, BSA u otras proteínas irrelevantes. Como se esperaba, SS1P y HN1 se unen solo a la mesotelina humana de longitud completa, no al péptido C-terminal.

Para evaluar si SD1-hFc reconoce el extremo C-terminal, se preincubó SD1-hFc, HN1, o SS1P con péptido mesotelina (residuos 539-588) y se ensayó la unión de la mezcla anticuerpo-péptido a la mesotelina humana recubierta en una placa ELISA. Los ELISA de competición (Figura 3B) mostraron que el péptido C-terminal bloqueaba la unión de SD1-hFc, no de SS1P o HN1, a la mesotelina humana de longitud completa, indicando que SD1-hFc se unía a la secuencia C-terminal y que la unión de SD1 a mesotelina no podía experimentar competición por SS1P y HN1. La cinética de la unión de SD1 también se midió usando la proteína mesotelina de longitud completa y el péptido C-terminal. SD1-hFc se une a la proteína mesotelina humana con equilibrio disociado ( $K_D$ ) de 13,59 nM, y al péptido con una ( $K_D$ ) de 16,08 nM. Las constantes de equilibrio y los gráficos de Scatchard se determinaron usando Prism (versión 3.02) para Windows (GraphPad software, San Diego, CA) (Kaneko et al., J Biol Chem 284: 3739-3749, 2009).

Para analizar si SD1 es adecuado para la terapia contra el cáncer, se determinó si SD1-hFc se une a moléculas de mesotelina nativas en células tumorales humanas. El análisis de citometría de flujo se realizó en un panel de células cancerosas de expresión de mesotelina y el número promedio de sitios de mesotelina por célula se midió experimentalmente usando el sistema de cuantificación de fluorescencia QuantiBRITE (Tabla 2). La proteína SD1-hFc se une a A431/H9, pero no a A431, lo que indica que la unión de SD1 a la mesotelina asociada a la superficie celular es altamente específica (Figura 4). La unión de SD1-hFc en un panel de líneas de células tumorales humanas nativas también se ensayó. Los estudios previos han demostrado que la mesotelina se expresa altamente en mesotelioma maligno, cáncer de ovario (Chang et al., Cancer Res 52: 181-186, 1992), adenocarcinoma de pulmón (Ho et al., Clin Cancer Res 13: 1571-1575, 2007) y colangiocarcinoma (Yu et al., J Cancer 1: 141-149, 2010). En el presente estudio, se encontró que SD1-hFc unido fuertemente a cáncer de ovario humano (OVCAR-8), mesotelioma (NCI-H226), líneas celulares humanas de NSCLC (EKVX y L55), y líneas celulares de colangiocarcinoma (KMBC y Mz-Cha -1); no se unió a las células de colangiocarcinoma, HuCCT1, que es una línea de mesotelina negativa (Yu et al., J Cancer 1: 141-149, 2010). Tomados en conjunto, estos resultados muestran que el anticuerpo humano SD1 reconoce un epitopo conformacional de mesotelina nativa cerca de la superficie de la célula cancerosa y se une a proteínas mesotelina nativas asociadas a la superficie celular con alta afinidad y excelente especificidad.

55

**Tabla 2. El número de sitios de mesotelina por célula en líneas celulares de cáncer**

Línea celular	Tipo de tumor	Sitios de mesotelina/célula	SD1(VH)-PE38 (nM)	BL22 (nM)
A431	Carcinoma epidermoide	Negativo*	>100	>100

H9	Expresión forzada de mesotelina en A431	$7 \times 10^5$	0,46	>100
NCI-H226	Mesotelioma	$5 \times 10^5$	1,25	>100
OVCAR-8	Cáncer de ovario	$5 \times 10^4$	3,84	>100
KMBC	Colangiocarcinoma	$1 \times 10^5$	1,62	>100
Mz-ChA-1	Colangiocarcinoma	$3 \times 10^4$	2,2	>100
HuCCT-1	Colangiocarcinoma	Negativo*	>100	>100

\*La ausencia de expresión de mesotelina fue validada por transferencia Western.

#### Actividad antitumoral de SD1-hFc: CDC y ADCC

Para evaluar la actividad antitumoral de SD1-hFc contra células cancerosas, se ensayó la actividad citotóxica en modelos de células A431/H9 y NCI-H226 en presencia de suero humano como fuente de complemento. SD1-hFc ejerció una potente actividad de CDC destruyendo el 40% de las líneas celulares de mesotelioma A431/H9 (Figura 5A) y más del 30% de NCI-H226 (Figura 5B) y no mostró actividad en la línea celular A431 negativa a mesotelina. Un anticuerpo de control irrelevante no mostró actividad a las mismas concentraciones. Esta es una observación importante ya que MORAb-009, un anticuerpo quimérico que se está evaluando actualmente en ensayos clínicos, no muestra actividad de CDC significativa contra células tumorales (Hassan et al., Cancer Immun 7: 20, 2007). Se ha sugerido que MORAb-009 unido a mesotelina también puede estar demasiado lejos de la superficie celular para que el complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento sea eficaz. Al dirigir un epítipo mesotelina cerca de la superficie de la célula, SD1-hFc unida a la mesotelina puede causar un MAC del complemento eficaz en la superficie de la célula cancerosa.

Para analizar el papel del complemento en la actividad antitumoral de SD1-hFc, se usó citometría de flujo para determinar la unión de C1q a células cancerosas que se hicieron reaccionar con mAb humanos antimmesotelina siguiendo un protocolo bien establecido para la caracterización de rituximab, ofatumumab y otros mAb terapéuticos anti-CD20 (Pawluczak et al., J Immunol 183: 749-758, 2009; Li et al., Cancer Res 68: 2400-2408, 2008). Se mostró previamente que al igual que MORAb-009, el mAb humano HN1 específico para la Región I de la mesotelina de superficie celular (lejos de la superficie celular) no presentaba ninguna actividad de CDC contra las células cancerosas que expresan mesotelina (Ho et al., Int J Cancer 128: 2020-2030, 2011). Como se muestra en las Figuras 5C y 5D, el complemento C1q unido a las células A431/H9 o NCI-H226 en presencia de SD1-hFc. Sin embargo, no se encontró unión de C1q en presencia de HN1 o una proteína de fusión de hFc de control. Además, la unión de C1q a las células cancerosas está asociada con la unión celular de SD1-hFc de una manera dosis-respuesta. Estos resultados demuestran que SD1-hFc de aglutinante del extremo C-terminal, no HN1 de aglutinante del extremo N-terminal, puede reclutar C1q para la superficie de la célula cancerosa que expresa mesotelina.

Además de la actividad de CDC, se ensayó la actividad de ADCC de SD1-hFc contra células tumorales. Se encontraron altos niveles de citotoxicidad usando SD1-hFc con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a diferentes concentraciones. SD1 exhibió una actividad de ADCC significativa tanto contra las células de mesotelioma A431/H9 (Figura 5E) como NCI-H226 (Figura 5F). No se encontró actividad en las células A431 negativas para mesotelina. También se ensayó la actividad de ADCC de SD1-hFc contra células tumorales usando células NK humanas purificadas. Las células NK humanas se incubaron con las células diana A431/H9 o NCI-H226 (a relaciones E:T de 5:1, 10:1 y 20:1) y 50 µg/ml de SD1-hFc. De nuevo, SD1 presentó una actividad de ADCC significativa tanto contra las células A431/H9 como NCI-H226 en todas las relaciones E:T (Figuras 5G-5H).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la proteína SD1-hFc tiene una potente actividad antitumoral de CDC y ADCC contra células tumorales que expresan mesotelina *in vitro*.

#### Actividad antitumoral en ratones

Para evaluar la actividad antitumoral de SD1-hFc *in vivo*, se usaron ratones inmunodeficientes portadores de xenoinjertos tumorales siguiendo un protocolo establecido para evaluar MORAb-009 en estudios preclínicos (Hassan et al., Cancer Immun 7: 20, 2007). Desde el día 7, se trataron ratones sin pelo portadores de tumores A431/H9 con 50 mg/kg de SD1-hFc (Figura 6A). El número de sitios de mesotelina en A431/H9 es comparable al de las células de mesotelioma malignas que expresan mesotelina de manera endógena y su implantación en ratones da como resultado consistentemente un crecimiento tumoral agresivo. Veinte días después de la inoculación de las células tumorales, el tamaño promedio del tumor en ratones tratados con SD1-hFc solo se redujo significativamente (promedio de 300 mm<sup>3</sup>) en comparación con el grupo de control (promedio de 1000 mm<sup>3</sup>). Estos resultados demuestran que SD1-hFc es muy activo como agente único. Usando el mismo protocolo, MORAb-009 como agente

único solamente indujo moderadamente la inhibición del crecimiento tumoral en ratones (Hassan et al., Cancer Immun 7: 20, 2007). ADCC y CDC son mecanismos importantes de destrucción de células tumorales mediada por anticuerpos utilizados en la terapia del cáncer. SD1-hFc causa tanto ADCC como CDC contra las células tumorales, pero MORAb-009 solo induce ADCC, no CDC. Por lo tanto, se cree que CDC desempeña un papel importante en su potente inhibición del crecimiento tumoral en ratones.

Para evaluar el CDC inducido por SD1 en ratones, se examinó la actividad de CDC usando sueros de ratón. SD1-hFc destruyó el 11% de células A431/H9 en presencia del 30% de suero de ratón recién extraído de ratones sin pelo (Figura 6B), lo que indica que los complementos de ratón fueron 10 veces menos activos que los complementos humanos (Figura 5) para SD1-hFc. Es consistente con estudios anteriores que muestran que para anticuerpos con un Fc humano, los complementos de ratón son menos activos que los complementos humanos (Di Gaetano et al., J Immunol 171: 1581-1587, 2003). HN1 no indujo niveles significativos de CDC. La ADCC inducida por SD1 y HN1 también se evaluó. Ambos anticuerpos fueron capaces de inducir niveles significativos de ADCC (Figura 6C). La pureza de las células NK de ratón se muestra en la Figura 6D).

En conclusión, se demostró que SD1-hFc induce una potente inhibición del crecimiento tumoral en ratones y CDC parece ser un mecanismo subyacente principal.

### Análisis

Se describe en el presente documento la identificación de SD1, un dominio de anticuerpo modificado que reconoce un epítipo en el extremo C-terminal de la mesotelina, mediante tecnología de presentación en fagos. Este epítipo no se superpone con los epítipos de ningún anticuerpo terapéutico actual (SS1P/MORAb-009 y HN1) que están en desarrollo preclínico y clínico para la terapia dirigida a la mesotelina. SD1 muestra una fuerte actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*. En ensayos *in vitro*, la proteína SD1-hFc muestra una fuerte actividad CDC contra las células cancerosas que expresan mesotelina. En la prueba de ratón *in vivo*, la proteína SD1-hFc muestra una potente inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados descritos en el presente documento indican que SD1 representa una nueva clase de mAb antimesotelina y pueden usarse como un anticuerpo terapéutico para la terapia dirigida a la mesotelina.

El dominio SD1 se aisló mediante inmunopurificación de fagos en un péptido C-terminal de 50 residuos de mesotelina. Se demostró que el anticuerpo se une a proteínas nativas de mesotelina en células cancerosas mediante citometría de flujo y ensayos de precipitación. No se une a proteínas mesotelina desnaturalizadas en transferencia Western, lo que indica que el dominio SD1 se une a un epítipo conformacional de mesotelina cerca de la superficie de la célula cancerosa. Nunca se ha accedido a esta región por ningún anticuerpo antimesotelina conocido (incluyendo SS1P/MORAb-009 y HN1). Se cree que es una estrategia importante desarrollar un anticuerpo dirigido a esta región. CDC es uno de los mecanismos de destrucción celular más potentes de los anticuerpos terapéuticos contra los tumores, pero puede requerir un sitio de unión al anticuerpo cerca de la membrana celular (Pawluczak et al., J Immunol 183: 749-758, 2009). Los presentes datos demuestran que la CDC desencadenada por SD1-hFc depende del nuevo epítipo específico porque HN1 (específico para el extremo N-terminal de mesotelina, Región I, lejos de la superficie celular) no presenta actividad de CDC y no puede reclutar C1q para las células cancerosas. Además, casi todos los anticuerpos de mesotelina existentes (por ejemplo, MORAb-009/amatuximab, SS1P, HN1) reconocen la Región I. Sin embargo, previamente se demostró que la abundante mucina MUC16/CA125 también se unía a la Región I de la mesotelina en las células cancerosas (Kaneko et al., J Biol Chem 284: 3739-3749, 2009) y podría competir con la unión al anticuerpo. SD1 no compete con la unión de MUC16/CA125 a la mesotelina; por lo tanto, la unión y actividad de SD1 a las células tumorales es poco probable que sea neutralizada por MUC16/CA125.

El ensayo en animales *in vivo* usando un modelo de tumor de xenoinjerto en ratones sin pelo mostró una potente actividad antitumoral de SD1-hFc. Usando un protocolo similar, el efecto antitumoral del mAb quimérico de ratón/humano MORAb-009 solo mostró una actividad antitumoral modesta, muy probablemente porque MORAb-009 no causa una actividad de CDC significativa contra las células tumorales (Hassan et al., Cancer Immun 7: 20, 2007). Para evaluar adicionalmente SD1-hFc en un microentorno tumoral, se generaron xenoinjertos de tumor humano en ratones y se demostró que SD1-hFc era de hecho muy activo *in vivo*.

Se han sugerido anticuerpos de dominio único de origen natural tales como VHH de camélido y VNAR de tiburón como una nueva clase de productos terapéuticos para la inmunoterapia del cáncer. Debido a la probabilidad de inmunogenicidad en seres humanos, estos anticuerpos animales no se pueden usar directamente para algunas aplicaciones clínicas. Por lo tanto, los VH de dominio único humano son candidatos atractivos para la terapia contra



el cáncer. Sin embargo, los VH humanos son típicamente propensos a la agregación (Arbabi-Ghahroudi et al., Methods Mol Biol 502: 341-364, 2009). En el presente estudio, SD1 VH se fusionó con CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> de IgGy1 humana y para producir SD1-hFc como una proteína de tipo IgG dimérica en células de mamífero HEK-293F. También se produjo una inmunotoxina recombinante basada en SD1, lo que podría inhibir la proliferación de células tumorales 5 positivas a mesotelina de una manera dependiente de la dosis (Tabla 2 y Figuras 7A-7B). Todas las proteínas recombinantes se plegaron adecuadamente para ensayos *in vitro* e *in vivo*.

En resumen, se generó el primer anticuerpo de dominio único humano contra tumores que expresan mesotelina y se demostró que tenía una potente actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* dirigiendo un epítipo cerca de la superficie de 10 la célula cancerosa a través de CDC y ADCC. A tal sitio de unión no se ha sido accedido por ningún anticuerpo antimmesotelina conocido actualmente en estudios preclínicos o clínicos.

### **Ejemplo 3: Anticuerpos monoclonales específicos de mesotelina para detectar cáncer en un sujeto o confirmar el diagnóstico de cáncer en un sujeto**

15 Este ejemplo describe el uso de anticuerpos monoclonales específicos de mesotelina, tales como los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento (por ejemplo, SD1 o SD2, o un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias CDR de SD1 o SD2) para la detección de cáncer en un sujeto. Este ejemplo describe 20 adicionalmente el uso de estos anticuerpos para confirmar el diagnóstico de cáncer en un sujeto.

Se obtiene una muestra de sangre del paciente diagnosticado con, o que se sospecha que tiene, un cáncer positivo a mesotelina (es decir, un cáncer que sobreexpresa mesotelina, tal como mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama triple negativo o cáncer de ovario). Una muestra de sangre tomada de un paciente que no tiene cáncer se 25 puede usar como control. Se realiza un ELISA para detectar la presencia de mesotelina soluble en la muestra de sangre. Las proteínas presentes en las muestras de sangre (la muestra del paciente y la muestra de control) se inmovilizan en un soporte sólido, tal como una placa de 96 pocillos, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Robinson et al., Lancet 362: 1612-1616, 2003). Después de la inmovilización, se aplica anticuerpo monoclonal específico de mesotelina marcado directamente con un marcador fluorescente a la placa 30 inmovilizada con proteína. La placa se lava en un tampón apropiado, tal como PBS, para eliminar cualquier anticuerpo no unido y para minimizar la unión no específica del anticuerpo. La fluorescencia se puede detectar usando un lector de placa fluorométrica de acuerdo con métodos estándar. Un aumento en la intensidad de fluorescencia de la muestra del paciente, con respecto a la muestra de control, indica que el anticuerpo antimmesotelina se une específicamente a proteínas de la muestra de sangre, detectando de este modo la presencia 35 de proteína de mesotelina en la muestra. La detección de la proteína mesotelina en la muestra del paciente indica que el paciente tiene un cáncer positivo a mesotelina positiva, o confirma el diagnóstico de cáncer en el sujeto.

### **Ejemplo 4: Anticuerpos monoclonales específicos de mesotelina para el tratamiento del cáncer**

40 Este ejemplo describe el uso de anticuerpos monoclonales específicos de mesotelina, tales como los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento (por ejemplo, SD1 o SD2, o un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias CDR de SD1 o SD2), para el tratamiento de cánceres que presentan la sobreexpresión de mesotelina (denominado en el presente documento cáncer "positivo a mesotelina"), incluyendo, pero sin limitación, mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células 45 escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama triple negativo u ovario cáncer. Los pacientes diagnosticados con un cáncer positivo a mesotelina pueden tratarse de acuerdo con procedimientos estándar en la técnica (véase, por ejemplo, Hassan et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 21: 29a, 2002; Kreiman et al., Proc. Am. Soc. Clinl Oncol. 21: 22b, 2002).

50 En un ejemplo, a los pacientes diagnosticados con un cáncer positivo a mesotelina se les administra un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo monoclonal específico de mesotelina unido a exotoxina de *Pseudomonas* (PE). Se ha descrito la preparación de inmunoconjugados de PE (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 7.081.518 y la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2005/0214304). En otro ejemplo, a los pacientes diagnosticados con un cáncer positivo a mesotelina se les administra SD1 o una 55 proteína de fusión SD1-hFc, que es capaz de inducir tanto CDC como ADCC y puede así mediar en la destrucción de células tumorales sin unirse a una toxina.

En algunos pacientes, SD1, SD1-hFc o el inmunoconjugado se administran por inyección en bolo intravenoso cada dos días durante un total de tres a seis dosis. En otros pacientes, el SD1, SD1-hFc o el inmunoconjugado se

administra por infusión intravenosa continua en el transcurso de diez días. La dosis de SD1, SD1-hFc o inmunoconjugado administrada a un paciente varía dependiendo del peso y el sexo del paciente, y el modo y el transcurso del tiempo de administración. Después del tratamiento, los pacientes se evalúan para determinar la progresión del cáncer (incluyendo el crecimiento tumoral y la metástasis), y otros signos clínicos de enfermedad.

5

En vista de las muchas realizaciones posibles a las que se pueden aplicar los principios de la invención descrita, se ha de reconocer que las realizaciones ilustradas son solamente ejemplos preferidos de la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En su lugar, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, se reclama como invención propia todo lo que se encuentra dentro del

10

**LISTA DE SECUENCIAS**

- 15 <110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES  
Ho, Mitchell  
Pastan, Ira H.  
Dimitrov, Dimiter S.
- 20 Tang, Zhewei  
Feng, Mingqian  
Gao, Wei
- 25 <120> ANTICUERPOS DE MESOTELINA Y MÉTODOS PARA PROVOCAR UNA POTENTE ACTIVIDAD ANTITUMORAL
- <130> 4239-89587-02
- <150> US 61/706.396
- 30 <151> 27-09-2012
- <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.5
- 35 <210> 1  
<211> 339  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 1  
caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctgattt cgatttcgct gcttatgaaa tgagctgggt cggccaggct 120  
ccaggacaag gccttgagtg ggtggcaatt atatcacatg atggaatcga taaatactac 180  
acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acaccctgag agccgaggac acagccacgt attactgttt aaggcttggt 300  
gctgtaggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcctcaagt 339
- 45 <210> 2  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 50

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 2

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

5

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Phe Asp Phe Ala Ala Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

Leu Arg Leu Gly Ala Val Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

Ser

10

<210> 3

<211> 613

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 3

ES 2 666 131 T3

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

ES 2 666 131 T3

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

ES 2 666 131 T3

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> 4  
 <211> 345  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 666 131 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 4

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro  
 1 5 10 15

Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu  
 20 25 30

Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala  
 35 40 45

Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu  
 50 55 60

Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln  
 65 70 75 80

Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu  
 85 90 95

Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn  
 100 105 110

Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr  
 115 120 125

Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg  
 130 135 140

Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln  
 145 150 155 160

Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu  
 165 170 175

Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln  
 180 185 190

Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala  
 195 200 205

Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg  
 210 215 220

ES 2 666 131 T3

Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu  
225 230 235 240

Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala  
245 250 255

Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp  
260 265 270

Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu  
275 280 285

Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro  
290 295 300

Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro  
305 310 315 320

Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro  
325 330 335

Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys  
340 345

<210> 5  
<211> 230  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 5  
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 Asp 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

Arg 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

5

10



ES 2 666 131 T3

Ala Ile Trp Arg 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 Arg 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 Arg 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 Glu 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 Lys Glu  
195 200 205

Gln 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> 6

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 6

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 Asp 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

Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala

5

10



<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (84)..(84)  
 5 <223> Xaa = Gly, Ser o Ala

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (107)..(107)  
 10 <223> Xaa = Gly, Ser o Ala

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (130)..(130)  
 15 <223> Xaa = Gly, Ser o Ala

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (165)..(165)  
 20 <223> Xaa = Gly, Ser o Ala

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (207)..(207)  
 25 <223> Xaa = Gly, Ser o Ala

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (209)..(209)  
 30 <223> Xaa = Gly, Ser o Ala

<400> 7  
 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

ES 2 666 131 T3

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> 8  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 8  
 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 Ala 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

Gly 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 Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr

5

10

ES 2 666 131 T3

85 90 95

Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala 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 Ala 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 Ser 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 Ser Glu  
 195 200 205

Ala 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> 9  
 <211> 622  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 9  
 Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro  
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln  
 20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu  
 35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg  
 50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu

10



ES 2 666 131 T3

Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met  
 325 330 335

Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu  
 340 345 350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val  
 355 360 365

Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile  
 370 375 380

Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu  
 385 390 395 400

Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp  
 405 410 415

Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr  
 420 425 430

Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu  
 435 440 445

Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp  
 450 455 460

Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala  
 465 470 475 480

Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile  
 485 490 495

Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser  
 500 505 510

Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr  
 515 520 525

Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly  
 530 535 540

Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg  
 545 550 555 560

Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu  
 565 570 575

ES 2 666 131 T3

Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser  
 580 585 590

Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro  
 595 600 605

Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala  
 610 615 620

- 5 <210> 10  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético
  
- <400> 10  
 gtcacacaa cctcgatgc gcggtgcagc ggtgcagtct gggggaggct tggtgta 55
  
- 15 <210> 11  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
  
- 20 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético
  
- <400> 11  
 gaagttgtga tgactccgga gcccttatgc tcatcgtcct ttagtcgcc gtgg 54
  
- 25 <210> 12  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
  
- 30 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético
  
- <400> 12  
 gtcacacaa ctccatagc caggtgcagc tgggtcagtc t 41
  
- 35 <210> 13  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
  
- 40 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético
  
- <400> 13  
 gaagttgtga tgacaagctt tggccgcact tggagagacg gtgaccaggg ttc 53
  
- 45 <210> 14  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
  
- 50



ES 2 666 131 T3

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 14

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctgattt cgctttcgat gattatgaaa tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggaaagg cccttgagtg gattggggac atcaatcata gtggaaccac catctacaac 180  
 ccgtccctca agagtcgagt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240  
 caaatgaaca ccctgagagc cgaggacaca gccatatatt actgtgcgag acctcactac 300  
 ggtgactact ctgatgcttt tgatatctgg ggccaagga caatggtcac cgtctcctca 360  
 5 agt 363

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 15

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

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado de dominio único que se une específicamente a mesotelina humana, en el que el anticuerpo comprende:
- 5 (i) restos de aminoácidos 26-35, 51-58 y 97-103 de SEQ ID NO: 2; o  
(ii) restos de aminoácidos 31-35, 51-66 y 99-102 de SEQ ID NO: 2.
2. El anticuerpo monoclonal aislado de dominio único de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo es al menos un 90% idéntica a SEQ ID NO:
- 10 3. El anticuerpo monoclonal de dominio único aislado de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo es al menos un 95% idéntica a SEQ ID NO: 2.
- 15 4. El anticuerpo monoclonal aislado de dominio único de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 2.
5. El anticuerpo monoclonal aislado de dominio único de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo es quimérico o sintético.
- 20 6. El anticuerpo monoclonal aislado de dominio único de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo está marcado.
7. El anticuerpo monoclonal aislado de dominio único de la reivindicación 6, en el que el marcador es un marcador fluorescente, enzimático o radiactivo.
- 25 8. Un inmunoconjugado aislado que comprende el anticuerpo monoclonal de dominio único de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y una molécula efectora.
9. Un inmunoconjugado aislado de la reivindicación 8, en el que la molécula efectora es una toxina.
- 30 10. Un inmunoconjugado aislado de la reivindicación 9, en el que la toxina es exotoxina de *Pseudomonas* o una variante de la misma.
- 35 11. Un inmunoconjugado aislado de la reivindicación 10, en el que la exotoxina de *Pseudomonas* o una variante de la misma, comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 3-8.
12. Una proteína de fusión que comprende el anticuerpo monoclonal de dominio único de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y una proteína heteróloga.
- 40 13. Una proteína de fusión de la reivindicación 12, en la que la proteína heteróloga es Fc humana.
14. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el anticuerpo monoclonal de dominio único de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 45 15. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) de la reivindicación 14, en el que el CAR comprende además un endodominio que comprende una cadena de señalización que tiene un motivo de activación de inmunorreceptor a base de tirosina (ITAM), particularmente en el que el endodominio comprende CD3 $\zeta$  o Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ .
- 50 16. Un anticuerpo biespecífico que comprende el anticuerpo monoclonal de dominio único de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y un segundo anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo.
17. Un anticuerpo biespecífico de la reivindicación 16, en el que el segundo anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a un componente del receptor de linfocitos T.
- 55 18. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal de dominio único de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, la proteína de fusión de la reivindicación 12 o 13, el CAR de la reivindicación 14 o 15, o el

anticuerpo biespecífico de la reivindicación 16 o 17 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. El anticuerpo monoclonal de dominio único de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, la proteína de fusión de la reivindicación 12 o 13, el CAR de la reivindicación 14 o 15, el anticuerpo biespecífico de la reivindicación 16 o 17, o la composición de la reivindicación 18 para su uso en un método para tratar un cáncer que expresa mesotelina o inhibir el crecimiento tumoral o metástasis de un tumor que expresa mesotelina en un sujeto, que comprende seleccionar un sujeto que tiene un cáncer que expresa mesotelina o un tumor que expresa mesotelina y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal de dominio único, el inmunoconjugado, la proteína de fusión, el CAR, el anticuerpo biespecífico, o la composición, tratando de este modo el cáncer que expresa mesotelina o inhibiendo el crecimiento tumoral o metástasis.

20. El anticuerpo monoclonal de dominio único, inmunoconjugado, proteína de fusión, CAR, anticuerpo biespecífico o composición para su uso en un método para tratar un cáncer que expresa mesotelina o inhibir el crecimiento tumoral o la metástasis de un tumor que expresa mesotelina en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el cáncer es mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama triple negativo o cáncer de ovario.

21. Un método *in vitro* para determinar si un sujeto tiene cáncer o confirmar un diagnóstico de cáncer en un sujeto, que comprende:

poner en contacto una muestra del sujeto con el anticuerpo monoclonal de dominio único de cualquiera de las reivindicaciones 1-7; y  
25 detectar la unión del anticuerpo a la muestra, en el que un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del anticuerpo a una muestra de control identifica que el sujeto tiene cáncer o confirma el diagnóstico de cáncer en el sujeto.

22. El método de la reivindicación 21, en el que el cáncer es mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama triple negativo o cáncer de ovario.

23. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo monoclonal de dominio único de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, el inmunoconjugado de las reivindicaciones 10 u 11, la proteína de fusión de la reivindicación 12 o 13, el CAR de la reivindicación 14 o 15, o el anticuerpo biespecífico de la reivindicación 16 o 17.

24. Una molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 23, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal de único dominio comprende la SEQ ID NO: 1.

25. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 23 o 24, unida operativamente a un promotor.

26. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 23-25.

27. Una célula huésped aislada transformada con la molécula de ácido nucleico o el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 23-26.

FIG. 1A

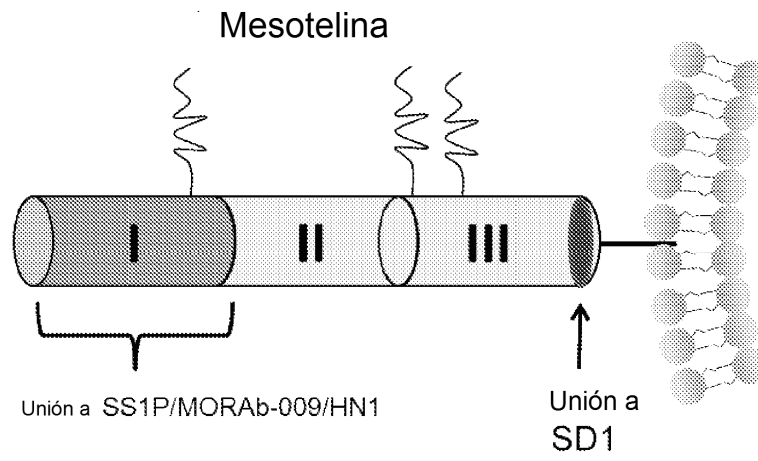
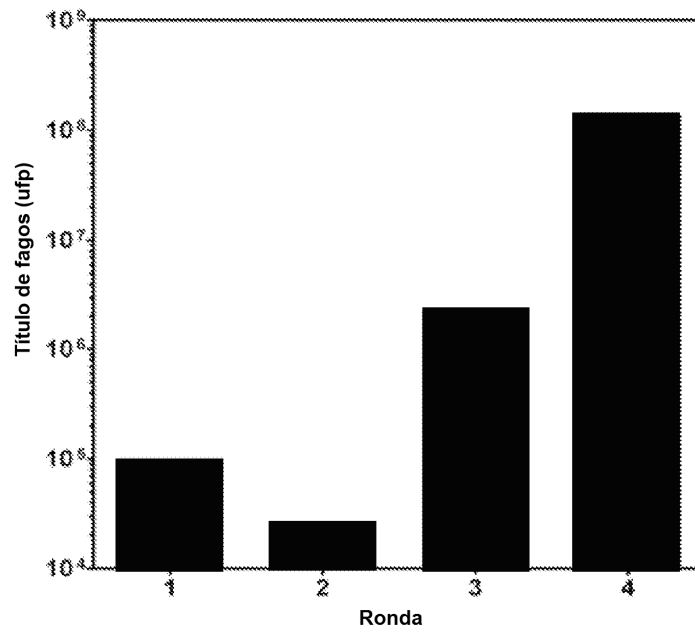
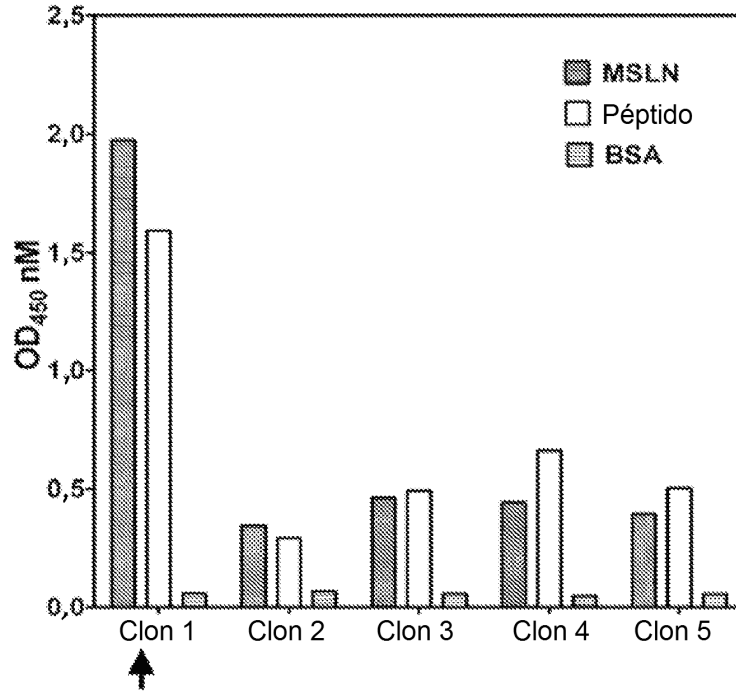


FIG. 1B

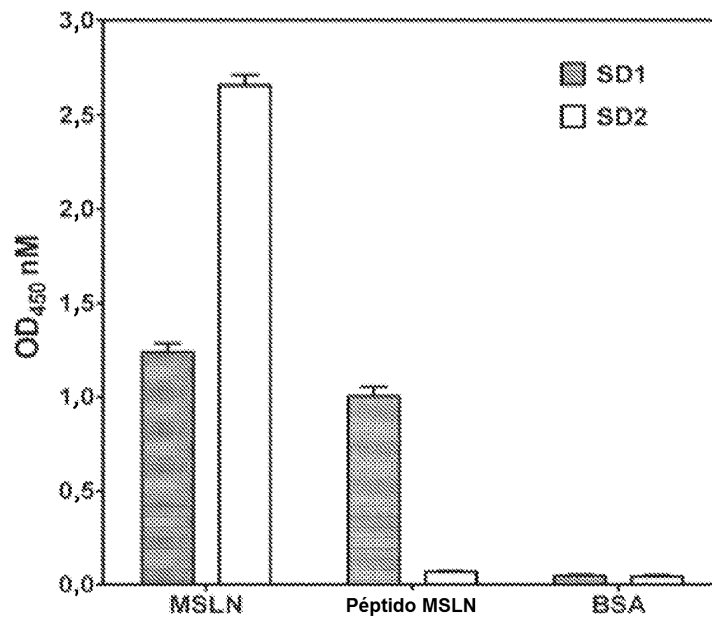


**FIG. 1C**

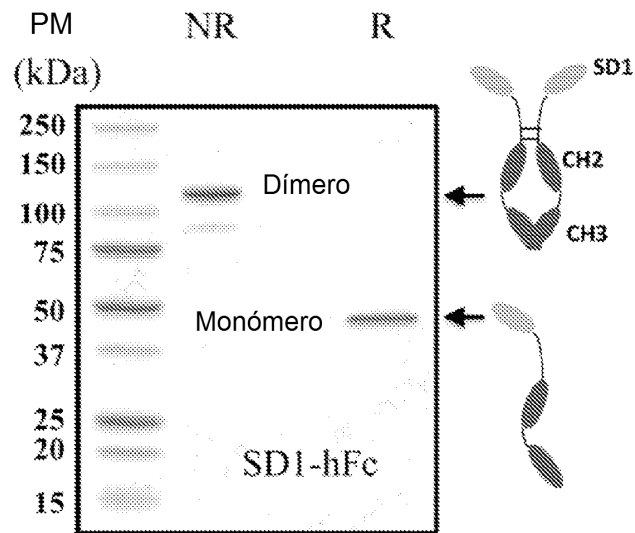


**SD1**

**FIG. 1D**



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

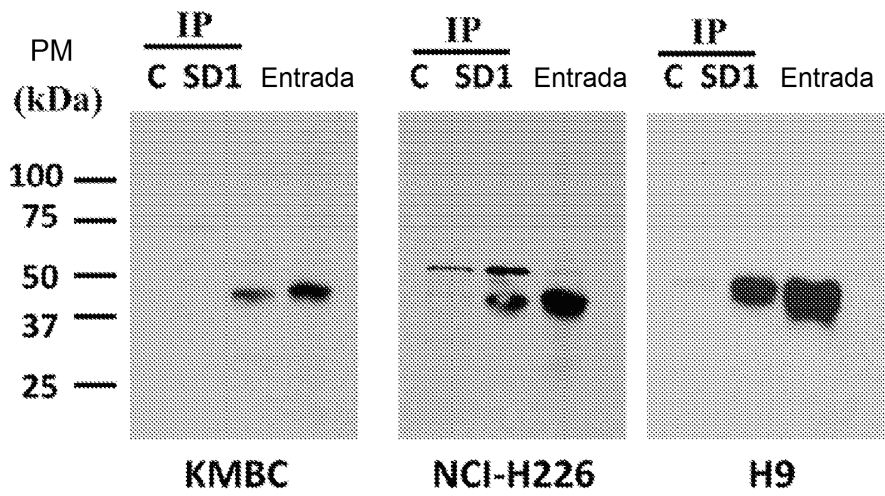


FIG. 3B

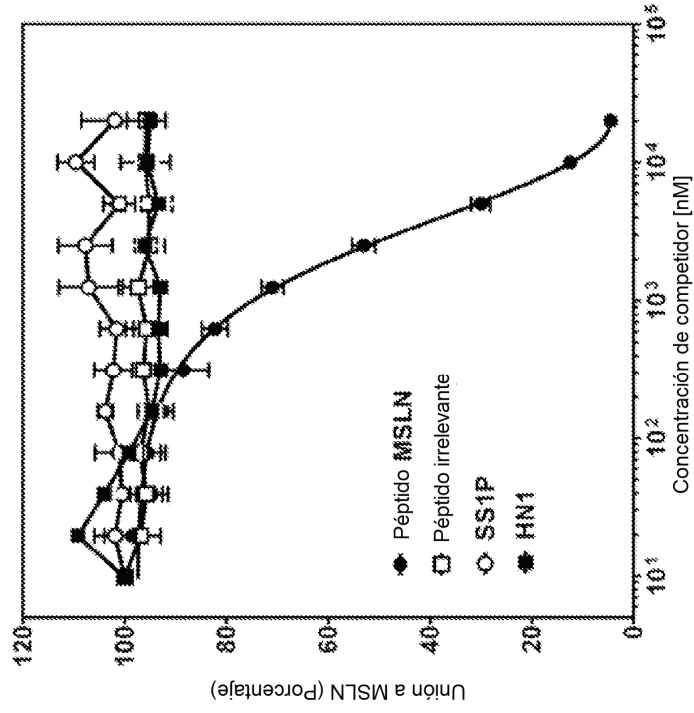


FIG. 3A

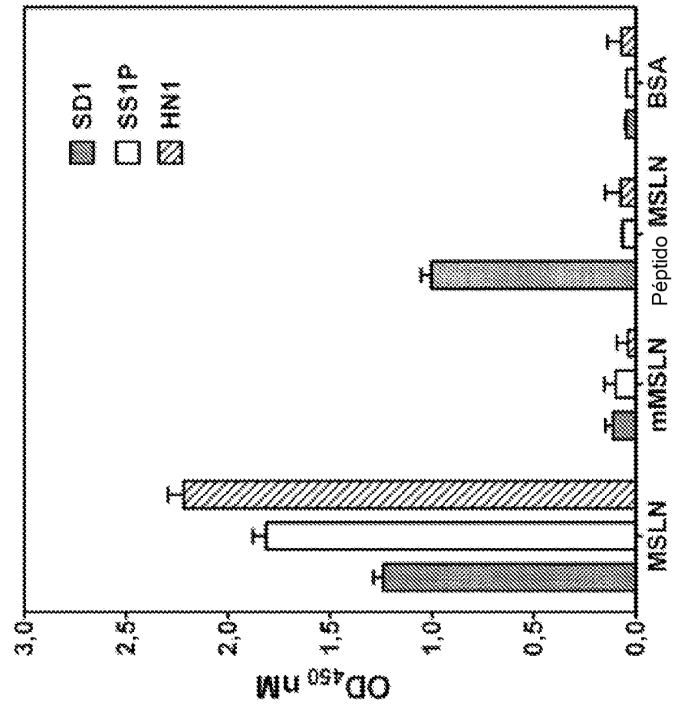


FIG. 3D

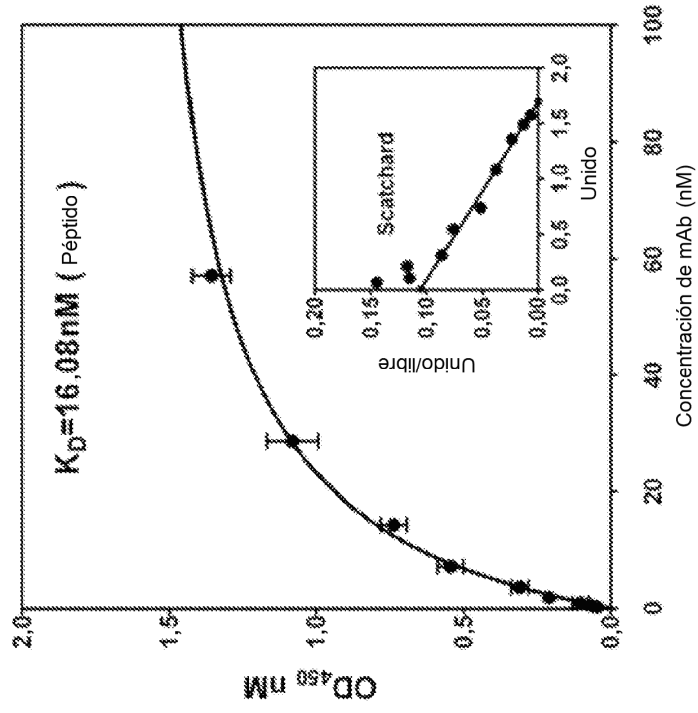


FIG. 3C

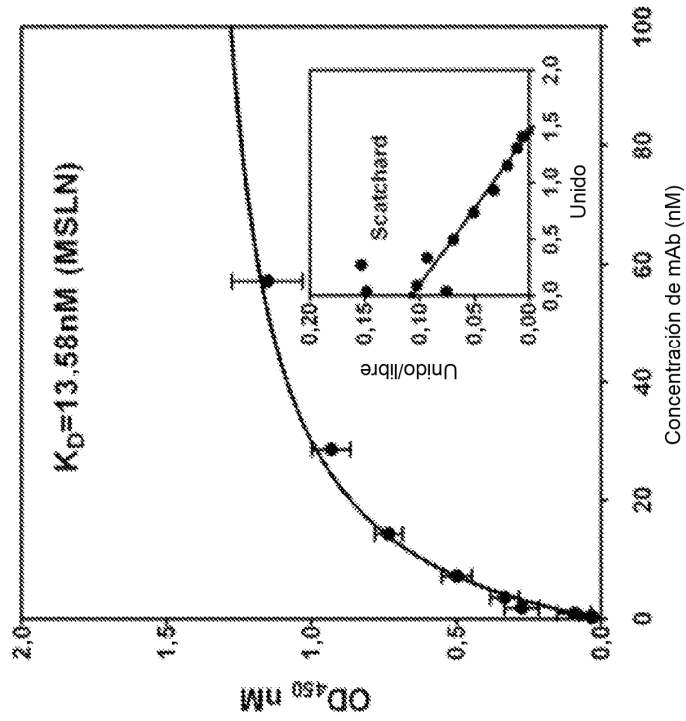
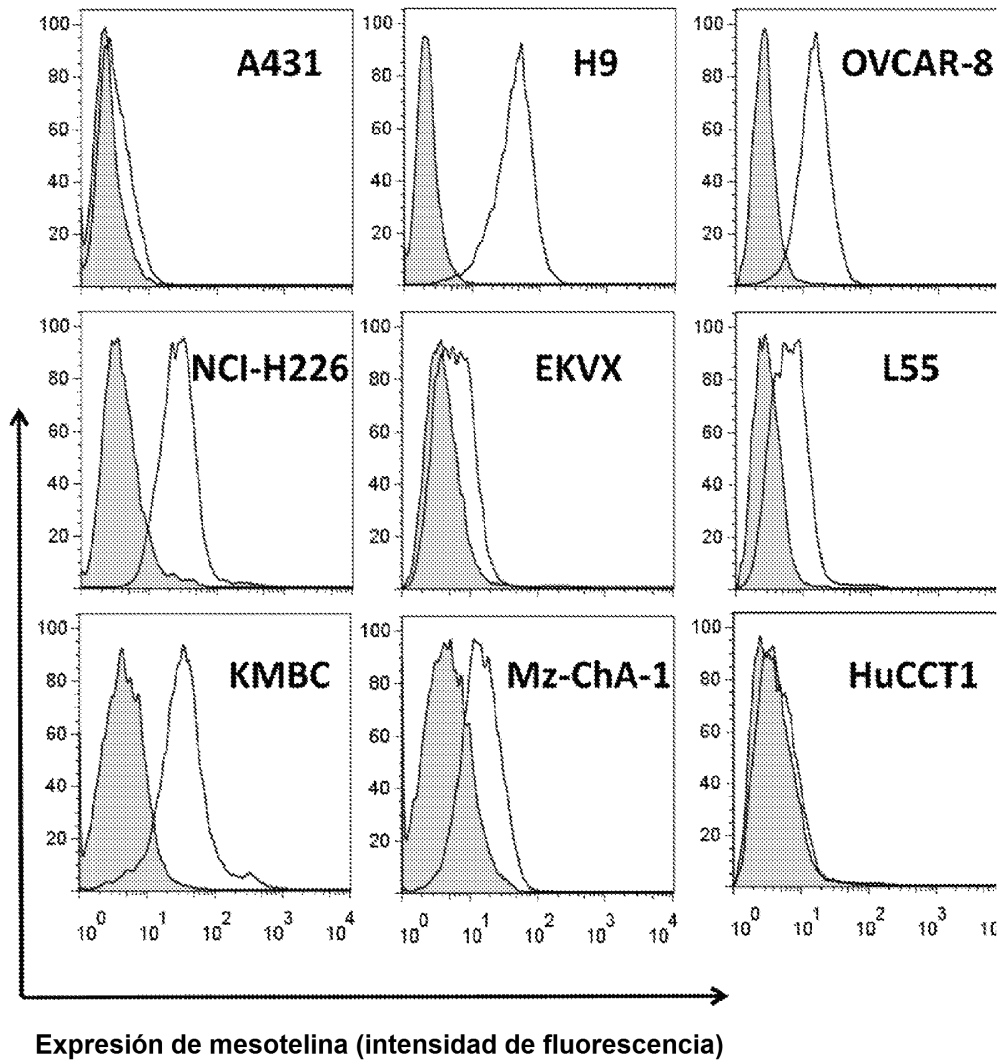
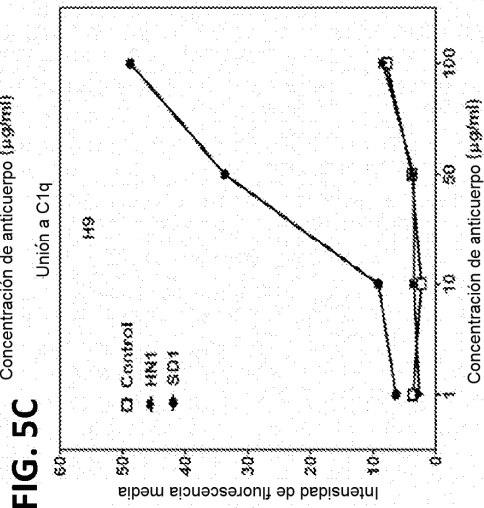
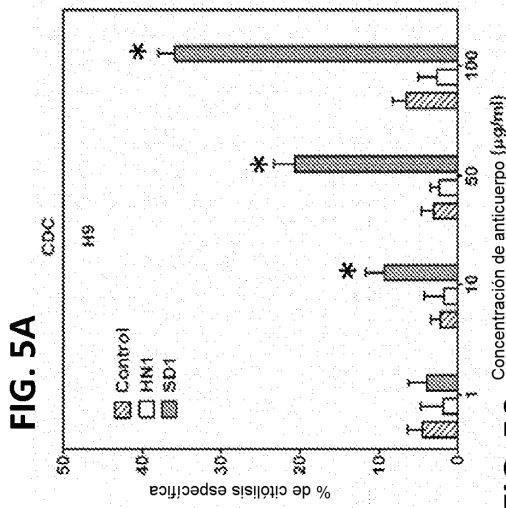
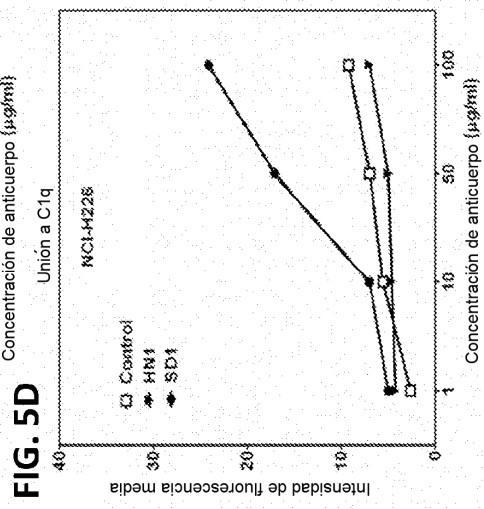
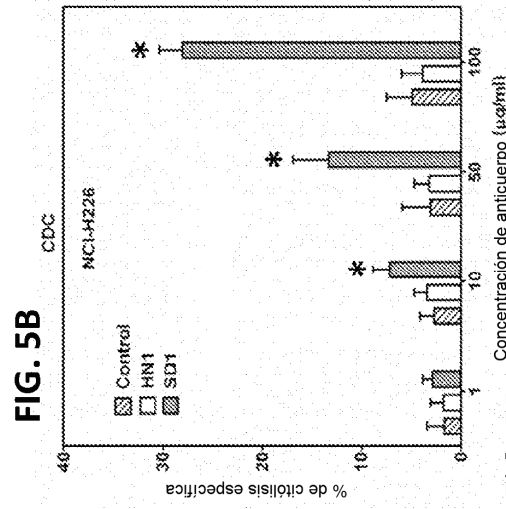




FIG. 4





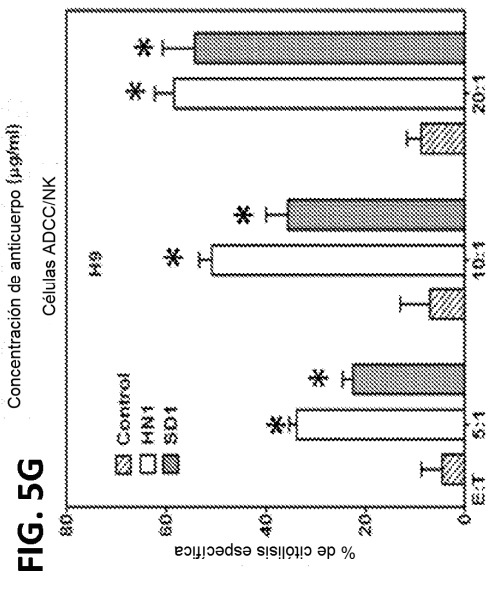
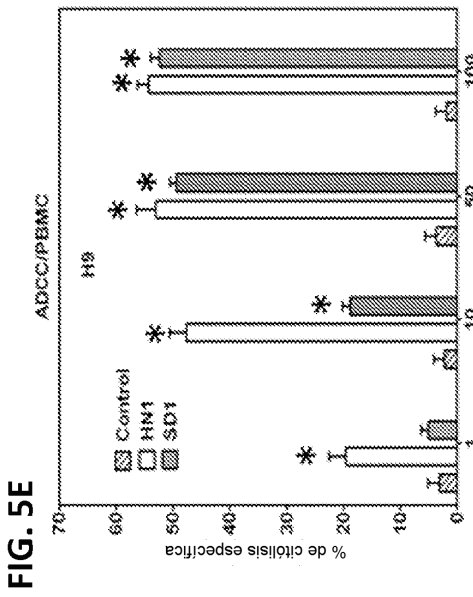
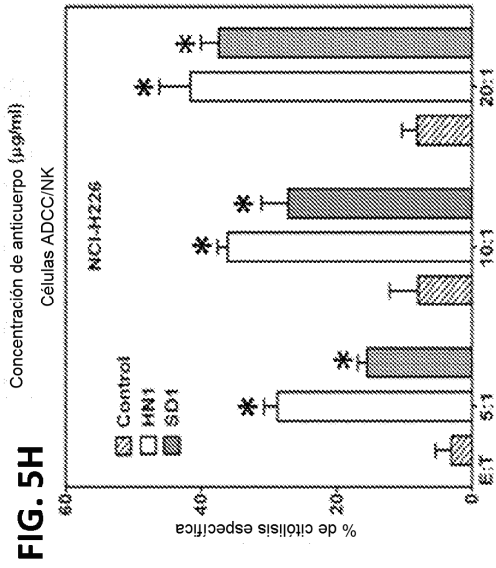
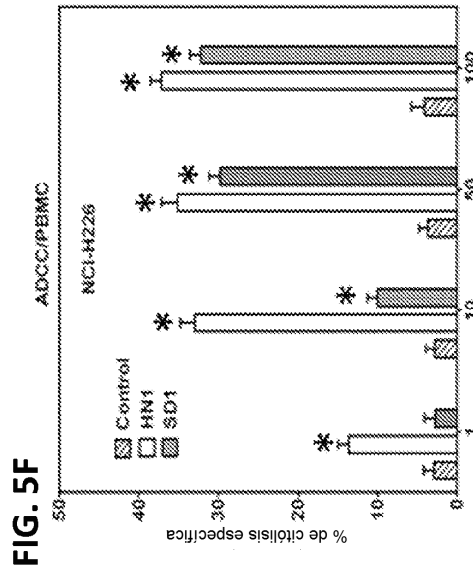


FIG. 6A

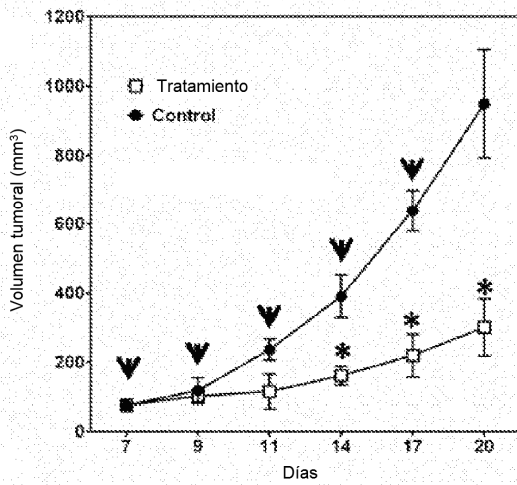


FIG. 6B

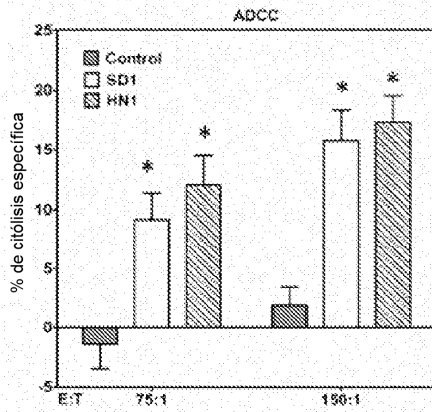
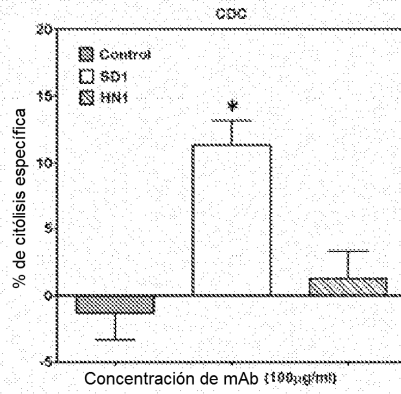


FIG. 6C

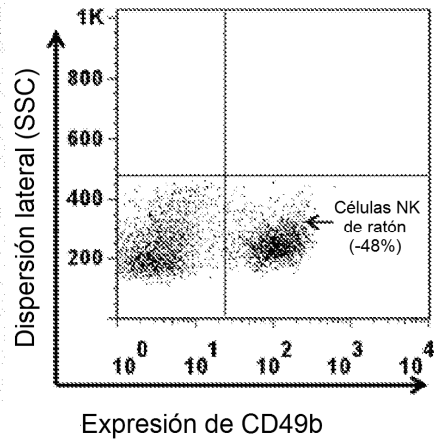


FIG. 6D

FIG. 7A

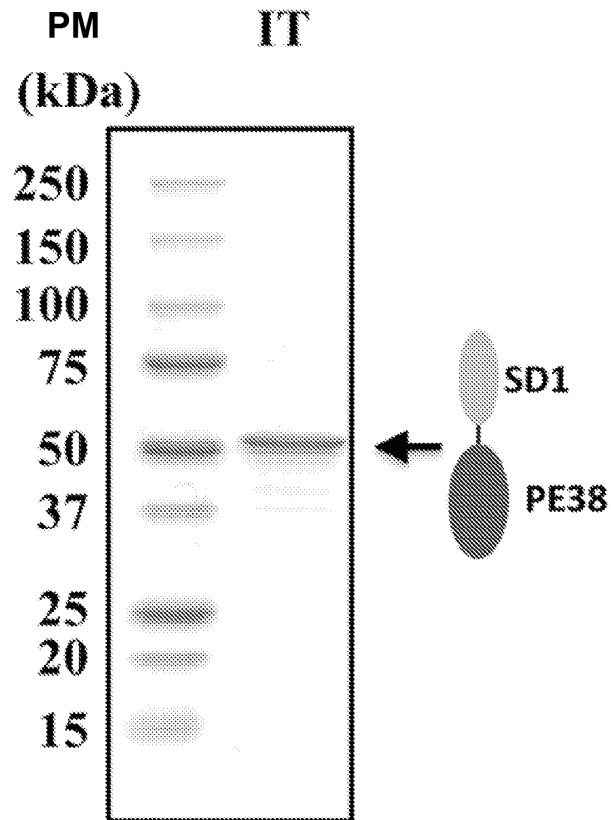


FIG. 7B

