



No. 13-135221- -00000-0000

Fecha: 2013-06-04 15:58:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~100~~ 191



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. 13-135221

ANTICUERPOS ANTI-MESOTELINA E INMUNOCONJUGADOS

54. TITULO _____

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE GENENTECH INC

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

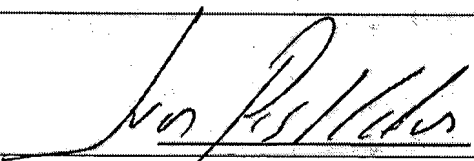
22. BOGOTÁ, D.C. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-135221- -00000-0000 Fecha: 2013-06-04 15:58:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 199- 191
---	---

AS. 124.843

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/065895	Fecha 19.12.2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/087962	Fecha 28.06.2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS ANTI-MESOTELINA E INMUNOCONJUGADOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
1. GENENTECH, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		1 DNA Way, 94080	No. TELÉFONO
CIUDAD		South San Francisco	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		CA	NACIONALIDAD O
PAÍS DE RESIDENCIA		US	LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. DENNIS		Mark	US
2. SCALES		Suzanna J.	GB
3. SPENCER		Susan D.	US
4. ZHANG		Yin	CN
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1. US		CA	South San Francisco
2. US		CA	South San Francisco
3. US		CA	South San Francisco
4. US		CA	South San Francisco
			DIRECCIÓN
			c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
			c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
			c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
			c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO		JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492
DIRECCIÓN		Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO 7442200
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO
PAÍS		CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. US		US	61/459,962
2.			
3.			
			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
			2010/12/20

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 13-41751, 13-46941, 13-41756	Fecha: 28.05.2013
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 5-99		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 70		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 111-142		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☒ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar:	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2012/087962 A3

(43) International Publication Date
28 June 2012 (28.06.2012)

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2011/065895
- (22) International Filing Date:
19 December 2011 (19.12.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/459,962 20 December 2010 (20.12.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR, US): GEN-ENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (71) Applicant (for AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR only): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): DENNIS, Mark [US/US]; c/o Genentech, Inc, 1 DNA Way, South San

Francisco, CA 94080 (US). SCALES, Suzanna J. [GB/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US). SPENCER, Susan D. [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US). ZHANG, Yin [CN/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

- (74) Agents: PASQUALONE, Danielle M. et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, Mail Stop 49, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTI-MESOTHELIN ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES

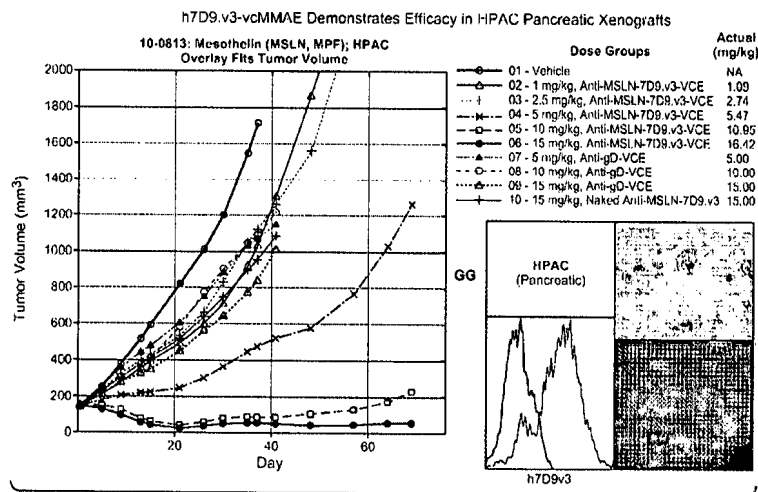


FIG. 26

(57) Abstract: The disclosure provides anti-mesothelin antibodies and immunoconjugates and methods of using the same.

WO 2012/087962 A3



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NF, SN, TD, TG).

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

Published:

(88) Date of publication of the international search report:

13 September 2012

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

ANTICUERPOS ANTI-MESOTELINA E INMUNOCONJUGADOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio en virtud de 35 USC 119(e) de la Solicitud Provisoria de los Estados Unidos Número 61/459962 presentada el 20 de diciembre de 2010, los contenidos de la cual se incorporan a la presente a modo de referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado en formato ASCII a través de EFS-Web y se incorpora a modo de referencia a la presente en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 29 de noviembre de 2011, se llama P4532R1.txt y tiene 53,145 de tamaño.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con anticuerpos anti-mesotelina e inmunoconjugados y métodos de uso de los mismos.

ANTECEDENTES

La mesotelina es una glicoproteína de la superficie celular con expresión normalmente restringida al mesotelio (peritoneo, pericardio y pleura). Sin embargo, la mesotelina está significativamente sobreexpresada en una variedad de tipos de tumor. La mesotelina interactúa con MUC16 (también llamado CA125), una glicoproteína de tipo mucina previamente identificada como un antígeno de tumor de ovario. MUC16 tiene un dominio extracelular que comprende al menos 14.000 residuos y se caracteriza por repeticiones en tándem de 156 aminoácidos cada uno, que se llaman repeticiones de mucina. (Véase, por ejemplo, O'Brien et al., *Tumour Biol.* 22:348–366 (2001); Yin et al., *J. Biol. Chem.* 276:27371–27375 (2001).) Se cree que la interacción entre la mesotelina y MUC16 tiene un rol en la adhesión celular heterotípica y metástasis. (Véase, por ejemplo, Rump et al., *J. Biol. Chem.* 279:9190–9198 (2004).)

La mesotelina se sintetiza como una proteína precursora 71 kDa, la porción madura de la cual se expresa en la superficie celular. La proteína precursora es escindida proteolíticamente por la furina en un componente circulante 31 kDa (al que se hace referencia como factor potenciador de megacariocito, o MPF) y componente de mesotelina 40 kDa. El último componente puede permanecer

asociado con la superficie celular a través de la unión GPI pero también puede circular a través de un mecanismo proteolítico.

Existe una necesidad en la técnica de agentes que se dirijan a la mesotelina para el diagnóstico y tratamiento de afecciones asociadas a la mesotelina, como cáncer. La invención satisface la necesidad y proporciona otros beneficios.

SÍNTESIS

La invención proporciona anticuerpos anti-mesotelina e inmunoconjugados y métodos de uso de los mismos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a mesotelina, en donde el anticuerpo se selecciona de: (i) un anticuerpo que se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E153 y D174 y que opcionalmente posee una o más de las siguientes características: (a) no presente unión reducida a formas glicosiladas de mesotelina; (b) no bloquea la unión de mesotelina a MUC16; y (c) se une a mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM; (ii) un anticuerpo que se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E211 y que opcionalmente posee una o más de las siguientes características: (a) no bloquea la unión de mesotelina a MUC16; y (b) se une a mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM; y (iii) un anticuerpo que se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 1–131 de SEQ ID N.º:43 y se une a mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo, humano, humanizado o quimérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a mesotelina. En ciertas realizaciones, la mesotelina es mesotelina humana de SEQ ID N.º:43.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende: (a) (i) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22, (ii) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19, y (iii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21; (b) (i) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:39, (ii) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35, y (iii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37; o (c) HVR–H3, HVR–L3, y HVR–H2 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA–11464. En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y (iii) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22; (b) (i)

HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:39; o (c) HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19; (b) (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:39, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35; o (c) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En otra realización, el anticuerpo comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19, y además comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una secuencia FR2 marco de SEQ ID N.º:25 y una secuencia FR3 de SEQ ID N.º:27.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19; (b) (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35; o (c) HVR-L1, HVR-

L2 y HVR–L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA–11464. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19, y además comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una secuencia FR2 marco de SEQ ID N.º:25 y una secuencia FR3 de SEQ ID N.º:27.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una secuencia VH que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:8; (b) una secuencia VL que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4; (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b); (d) una secuencia VH que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:16; (e) una secuencia VL que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:12; (f) una secuencia VH como en (d) y una secuencia VL como en (e); (g) una secuencia VH que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la secuencia VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA–11464; (h) una secuencia VL que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA–11464; o (i) una secuencia VH como en (g) y una secuencia VL como en (h). En una de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID N.º:8, una secuencia VH de SEQ ID N.º:16, o una secuencia VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA–11464. En otra de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VL de SEQ ID N.º:4, una secuencia VL de SEQ ID N.º:12, o una secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA–11464.

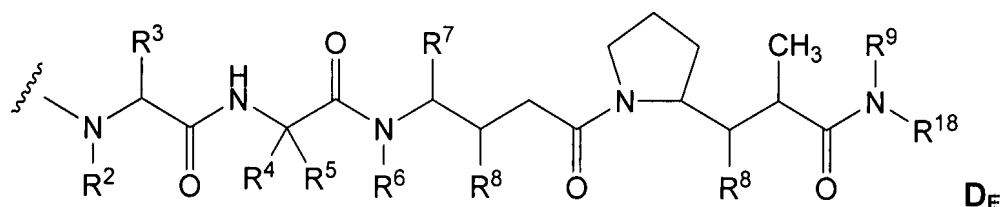
En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) una secuencia VH de SEQ ID N.º:8 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:4; (b) una secuencia VH de SEQ ID N.º:16 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:12; (c) una secuencia VH y una secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA–11464; o (d) el anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA–11464.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores en un anticuerpo IgG1, IgG2a o IgG2b.

En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores. En una realización, se proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico. En otra realización, se proporciona un método de producción de un anticuerpo, el método que comprende cultivar la célula huésped de manera que se produzca el anticuerpo.

En otro aspecto, se proporciona un inmunoconjugado que posee la fórmula $Ab-(L-D)_p$, en donde:

- (a) Ab es un anticuerpo como en cualquier realización anterior;
- (b) L es una unión;
- (c) D es un fármaco de la fórmula D_E

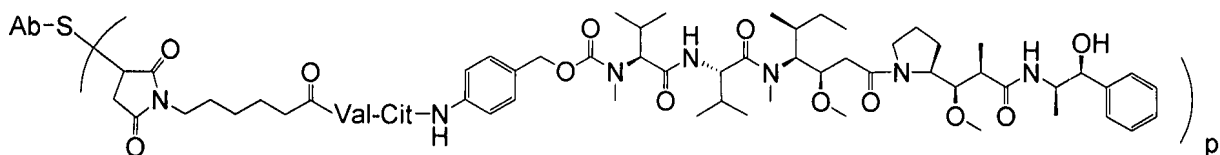


y en donde R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es H, R^7 es sec-butilo, cada R^8 es independientemente seleccionado de CH_3 , $O-CH_3$, OH , y H; R^9 es H; y R^{18} es $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo; y

- (d) p varía entre 1–8.

En una realización, el fármaco es una auristatina. En una dichas realizaciones, el fármaco es MMAE. En otra realización, la unión es escindible por una proteasa. En una de dichas realizaciones, la unión comprende un dipéptido val-cit.

En una realización adicional, el inmunoconjugado posee la fórmula:



en donde S es un átomo de azufre. En una de dichas realizaciones, p varía desde 2–5. En otra de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21, (iii) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22, (iv) HVR–L1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19. En otra de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:39, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35. En otra de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una secuencia VH de SEQ ID N.º:8 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:4. En otra de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende (b) una secuencia VH de SEQ ID N.º:16 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:12.

En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un inmunoconjugado como en cualquiera de las realizaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la formulación farmacéutica además comprende un agente terapéutico adicional. En una de dichas realizaciones, el agente terapéutico adicional es gemcitabina. En otra de dichas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-MUC16 conjugado a un agente citotóxico.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un inmunoconjugado como en cualquiera de las realizaciones anteriores para el uso como un medicamento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un inmunoconjugado como en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de un cáncer positivo para mesotelina. En una de dichas realizaciones, el cáncer positivo para mesotelina se selecciona de cáncer pancreático, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer endometrial, y mesotelioma. En otra de dichas realizaciones, el cáncer positivo para mesotelina es un cáncer dual-positivo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un inmunoconjugado como en cualquiera de las realizaciones anteriores en la producción de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de un cáncer positivo para mesotelina. En una de dichas realizaciones, el cáncer positivo para mesotelina se selecciona de cáncer pancreático, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer endometrial y

mesotelioma. En otra de dichas realizaciones, el cáncer positivo para mesotelina es un cáncer dual-positivo.

En otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que posee un cáncer positivo para mesotelina, el método que comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un inmunocongugado como en cualquiera de las realizaciones anteriores. En una realización, el cáncer positivo para mesotelina se selecciona de cáncer pancreático, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer endometrial y mesotelioma. En otra realización, el cáncer positivo para mesotelina es un cáncer dual-positivo. En otra realización, el método además comprende la administración de un agente terapéutico adicional al individuo. En una de dichas realizaciones, el agente terapéutico adicional es gemcitabina. En otra de dichas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-MUC16 conjugado a un agente citotóxico.

En otro aspecto, se proporciona un método de inhibir la proliferación de una célula positiva para mesotelina, el método que comprende la exposición de la célula a un inmunocongugado como en cualquiera de las realizaciones anteriores en condiciones que permitan la unión del inmunocongugado a mesotelina sobre la superficie de la célula, de este modo se inhibe la proliferación de la célula. En una realización, la célula es una célula pancreática, de ovarios, de pulmón, mesotelioma o célula endometrial. En otra realización, la célula es una célula dual-positiva.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo como en cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo se conjuga a un marcador. En una realización, el marcador es un emisor de positrones. En una de dichas realizaciones, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

En otro aspecto, se proporciona un método de detección de mesotelina humana en una muestra biológica, el método que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-mesotelina como en cualquiera de las realizaciones anteriores en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-mesotelina a una mesotelina humana que ocurre naturalmente, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-mesotelina y una mesotelina humana que ocurre naturalmente en una muestra biológica. En una realización, el anticuerpo anti-mesotelina comprende (a) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464; (b) una secuencia VH y una secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de

ATCC PTA-11464; o (d) el anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En otra realización, la muestra biológica es una muestra de cáncer pancreático, muestra de cáncer de ovarios, muestra de cáncer de pulmón, muestra de cáncer endometrial, o muestra de mesotelioma. En otra realización, el método comprende realizar la inmunohistoquímica en una sección de tejido. En otra realización, la muestra biológica es suero.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar cáncer positivo para mesotelina, el método que comprende la administración de un anticuerpo anti-mesotelina marcado, en donde el anticuerpo anti-mesotelina es como en cualquiera de las realizaciones anteriores, a un sujeto que padece o se sospecha que padece un cáncer positivo para mesotelina, y detecta el anticuerpo anti-mesotelina marcado en un sujeto, en donde la detección del anticuerpo anti-mesotelina marcado indica un cáncer positivo para mesotelina en el sujeto. En una realización, el anticuerpo anti-mesotelina marcado comprende un anticuerpo anti-mesotelina conjugado a emisor de positrones. En una de dichas realizaciones, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra que la mesotelina es generada por la escisión proteolítica de una proteína precursora en un componente de circulación 31 kDa (al que se hace referencia como factor potenciador megacariocito, o MPF) y un componente de mesotelina 40 kDa. El último componente puede permanecer asociado con la superficie celular pero también puede ser circulante. "CHO" representa los cuatro sitios de glicosilación, uno en MPF y tres en mesotelina.

La **Figura 2** muestra una representación gráfica de los niveles de expresión génica de mesotelina humana en varios tejidos, como se describe en el Ejemplo A.

La **Figura 3** muestra las propiedades de los anticuerpos monoclonales anti-mesotelina asilados como se describe en el Ejemplo B.

La **Figura 4** muestra una alineación de las secuencias de región de cadena liviana variable de anticuerpo murino 7D9 (mu7D9) y variantes humanizadas del mismo (7D9.v1 y 7D9.v3).

La **Figura 5** muestra una alineación de las secuencias de región de cadena pesada variable de anticuerpo murino 7D9 (mu7D9) y variantes humanizadas del mismo (7D9.v1 y 7D9.v3).

La **Figura 6** muestra las propiedades de variantes quiméricas y humanizadas de 7D9, como se describe en el Ejemplo C.

La **Figura 7** muestra una alineación de las secuencias de región de cadena liviana variable de anticuerpo murino 22A10 (22A10) y variantes humanizadas del mismo (hu22A10injerto y 22A10.v83).

La **Figura 8** muestra una alineación de las secuencias de región de cadena pesada variable de anticuerpo murino 22A10 (22A10) y variantes humanizadas del mismo (hu22A10injerto y 22A10.v83).

La **Figura 9A** muestra el análisis de Scatchard de variantes humanizadas de 22A10 en células BJAB transfectadas con mesotelina establemente, como se escribe en el Ejemplo C.

La **Figura 9B** muestra la inmunoprecipitación de mesotelina mediante variantes humanizadas de 22A10 de las mismas células BJAB transfectadas establemente, como se escribe en el Ejemplo C.

La **Figura 10A** muestra las secuencias de regiones hipervariables y marco de variantes humanizadas de 7D9.

La **Figura 10B** muestra las secuencias de regiones hipervariables y marco de variantes humanizadas de 22A10.

La **Figura 11** muestra la homología de secuencia entre la mesotelina de diferentes especies, como se describe en el Ejemplo D. La Figura 11 describe las SEQ ID N.º: 43 y 46–48, respectivamente, en orden de aparición.

La **Figura 12** muestra las reactividades cruzadas de h7D9.v3 y h22A10.v83 con mesotelina de especies diferentes, como se describe en el Ejemplo D.

La **Figura 13** muestra las afinidades de anticuerpos anti-mesotelina humanizados como se determina por el análisis de Scatchard de líneas celulares transfectadas que expresan en forma estable mesotelina y líneas celulares que expresan mesotelina endógena, como se describe en el Ejemplo E.

La **Figura 14** muestra los resultados de los ensayos de competición entre el anticuerpo 7D9 o 22A10 y otros anticuerpos monoclonales enumerados en la Figura 3, como se describe en el Ejemplo F.

La **Figura 15** muestra constructos de mesotelina quimérica utilizados para el mapeo del epítipo (dibujado a escala), como se describe en el Ejemplo G. La Figura 15 describe “EVEK,” “DAEQ,” y “DVER” como SEQ ID N.º: 51–53, respectivamente.

La **Figura 16** muestra los resultados de FACS para evaluar la unión de 7D9 y 22A10 a las células que expresan la mesotelina quimérica, como se describe en el Ejemplo G.

La **Figura 17** muestra una estrategia mutacional para identificar los aminoácidos a los que se unen h7D9.v3 y h22A10.v83, como se describe en el Ejemplo G. La Figura 17 describe "EVEK" como SEQ ID N.º: 51; "Humano132–212," "Cyno132–212," "Rata132–212," y "Ratón132–212", como SEQ ID N.º: 54–57, respectivamente; "MUT1," "MUT3," "MUT6," "MUT7," "MUT9," "MUT10," "MUT13," y "MUT15," humano y de ratón, como SEQ ID N.º: 58–73, respectivamente; y "STKD" y "SVKD", como SEQ ID N.º: 73 y 74, respectivamente.

La **Figura 18A** muestra los resultados de FACS para evaluar la unión de h7D9.v3 y h22A10.v83 a las células que expresan mutantes de mesotelina humana, como se describe en el Ejemplo G.

La **Figura 18B** muestra los resultados de FACS para evaluar la unión de h7D9.v3 a las células que expresan mutantes de mesotelina de monos cynomolgus, como se describe en el Ejemplo G.

La **Figure 19** muestra los residuos de aminoácidos clave dentro de los epítomos a los que se unen 7D9/h7D9.v3 y 22A10/h22A10.v83, como se describe en el Ejemplo G. La Figura 19 describe SEQ ID N.º: 54–57, respectivamente, en orden de aparición.

La **Figura 20** muestra la unión de h7D9.v3 a mesotelina glicosilada, como se describe en el Ejemplo H.

La **Figura 21** muestra los resultados de dos ensayos para determinar si los anticuerpos 19C3, 7D9 y 22A10 bloquean la unión de mesotelina a MUC16 y viceversa, como se describe en el Ejemplo I.

La **Figura 22** muestra la expresión de mesotelina en el adenocarcinoma ductal pancreático mediante inmunohistoquímica (IHC), como se describe en el Ejemplo J.

La **Figura 23** muestra la expresión de mesotelina en tumores adenocarcinoma seroso de ovario mediante inmunohistoquímica (IHC), como se describe en el Ejemplo J.

La **Figura 24** muestra la expresión de mesotelina en el adenocarcinoma célula de pulmón no pequeña (NSCLC) mediante inmunohistoquímica (IHC), como se describe en el Ejemplo J.

La **Figura 25** muestra la expresión de mesotelina en tejidos de mono cynomolgus (paneles derechos) mediante inmunohistoquímica (IHC), como se describe en el Ejemplo J.

La **Figura 26** muestra que el inmunoconjugado h7D9.v3–vcMMAE demuestra eficacia en xenoinjertos pancreáticos de HPAC, como se describe en el Ejemplo L.

La **Figura 27** muestra que el inmunoconjugado h7D9.v3–vcMMAE demuestra eficacia en xenoinjertos pancreático primario, como se describe en el Ejemplo M.

La **Figura 28** muestra que el inmunoconjugado h7D9.v3–vcMMAE demuestra eficacia en un modelo de xenoinjerto de tumor de ovario, como se describe en el Ejemplo N.

La **Figura 29** muestra que el inmunoconjugado h7D9.v3–vcMMAE demuestra eficacia en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de célula escamosa de pulmón, como se describe en el Ejemplo O.

La **Figura 30** muestra la eficacia del inmunoconjugado h7D9.v3–vcMMAE respecto de la mesotelina human es similar a la del inmunoconjugado h22A10.v83–vcMMAE respecto de la mesotelina de mono cynomolgus en modelos de tumor de xenoinjerto BJAB transfectados, como se describe en el Ejemplo P.

La **Figura 31** muestra la eficacia del inmunoconjugado h7D9.v3–vcMMAE es similar a la del inmunoconjugado h22A10.v83–vcMMAE en mesotelina y modelos de tumor de ovarios, como se describe en el Ejemplo P.

La **Figura 32** muestra que MUC16 forma un complejo con mesotelina, y dos proteínas son co-circulares de la líneas celulares duales-positivas, como se describe en el Ejemplo Q.

La **Figura 33** muestra que 19C3, pero no 7D9, desplaza el MUC16 pre-unido de mesotelina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES DE LA INVENCION

DEFINICIONES

Un “marco humano aceptante” a los fines de la presente es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena liviana (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano aceptante “derivado de” un marco de inmunoglobulina humana o marco consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de

aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, el marco humano aceptante VL es idéntico en secuencia a la secuencia marco de inmunoglobulina humana VL o secuencia marco consenso humana.

“Afinidad” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). Salvo que se indique del modo contrario, como se utiliza en la presente “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, un anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, con inclusión de aquellos descritos en la presente. Las realizaciones ejemplares e ilustrativas específicas para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

Un anticuerpo de “afinidad madura” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVRs), en comparación con un anticuerpo progenitor que no posee dichas alteraciones, tales alteraciones que dan por resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Los términos “anticuerpo anti-mesotelina” o “anticuerpo que se une a mesotelina” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a mesotelina con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o agente terapéutico para dirigirse a mesotelina. En una realización, la extensión de la unión de un anticuerpo anti-mesotelina a una proteína no-mesotelina no relacionada es menos de aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a mesotelina como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a mesotelina tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, o $\leq 0,001\text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, desde 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, desde 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-mesotelina se une a un epítipo de mesotelina que se conserva dentro de mesotelina de especies diferentes.

El término “anticuerpo” se utiliza en la presente en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpo, con inclusión, a título ilustrativo, de anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos

(por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta del anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto y que se une al antígeno al que el anticuerpo intacto se une. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, a título ilustrativo, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" como un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más, y por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más. Un ensayo de competición ejemplar se proporciona en la presente.

Los términos "cáncer" y "cancerígeno" se refieren o describen la afección patológica en mamíferos que es típicamente caracterizada por la proliferación /crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, a título ilustrativo, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma de no Hodgkin), blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de cadena pesada y/o liviana deriva de una especie o fuente particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana deriva de una especie o fuente diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseida por su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos. IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de éstas pueden además dividirse

en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, y IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a diferentes clases de inmunoglobulinas son llamados α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente.

El término “agente citotóxico” como se utiliza en la presente se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, a título ilustrativo, isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos o fármacos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca, (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicin u otros agentes intercalantes) agentes inhibidores de crecimiento; enzimas y fragmentos de los mismos como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas, como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacterial, fungicida, vegetal o animal, con inclusión de fragmentos y/o variantes de los mismos, y varios agentes antitumor y anticancerígenos descriptos a continuación.

El término “cáncer dual-positivo” se refiere a un cáncer que comprende células que son tanto positivos para mesotelina como para MUC16.

El término “célula dual-positiva” se refiere a una célula que expresa tanto mesotelina como MUC16 en su superficie.

“Funciones efectoras” se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varía con el isótopo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés) y unión C1q; unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B), y activación de célula B.

Una “cantidad efectiva” de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por periodos de tiempo necesario, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término “epítipo” se refiere al sitio particular en una molécula de antígeno a la que se une un anticuerpo.

El término “región Fc” en la presente se utiliza para definir una región terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de

IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, a la terminal carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina de terminal C (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. Salvo que específicamente se determine de otro modo en la presente, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o la región constante está de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

“Marco” o “FR” se refiere a residuos de dominio variable distintos de los residuos de región hipervariable (HVR, por sus siglas en inglés). El FR de un dominio variable generalmente consta de cuatro dominios FR. FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las HVR y secuencias FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL). FR1–H1(L1)–FR2–H2(L2)–FR3–H3(L3)–FR4.

Los términos “anticuerpo de longitud completa,” “anticuerpo inactivo,” y “anticuerpo completo” como se utiliza en la presente se utilizan de manera indistinta para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en la presente.

El término “formas glicosiladas de mesotelina” se refiere a las formas que ocurren naturalmente de mesotelina que son post–translacionalmente modificadas por el agregado de residuos de carbohidrato.

Los términos “célula huésped,” “línea de célula huésped,” y “cultivo de célula huésped” se utilizan en la presente de manera indistinta y hacen referencia a las células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, con inclusión de la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen “transformantes” y células transformadas” que incluyen la célula transformada primaria y progenie derivada de la misma independientemente del número de pasajes. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a la célula progenitora, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica como se clasifica o selecciona en la célula originalmente transformada se incluye en la presente.

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde al de un anticuerpo producido por un humano o célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humano u otras secuencias que codifican anticuerpo humano. La definición de un

anticuerpo humano específicamente excluye un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humano.

Una "secuencia consenso humana" es un marco que representa los residuos de aminoácido que ocurren más comúnmente en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencia es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, NIH Publicación 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una realización, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En una realización, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVRs no humanas y residuos de aminoácidos de FRs humanos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a aquellos de un anticuerpo no humano, y todos o sustancialmente todos los FR corresponden aquellos de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se utiliza en la presente, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). Generalmente, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVR, tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), está última siendo de la variabilidad de secuencia más alta y/o involucrada en el reconocimiento del antígeno. Los bucles hipervariables ejemplares ocurren en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3) ocurren en los residuos aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3,

31–35B de H1, 50–65 de H2, y 95–102 de H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los residuos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden “residuos de determinación de especificidad,” o “SDR,” que son residuos que contactan el antígeno. Los SDRs están contenidos dentro de las regiones de las CDRs llamadas CDR abreviadas, o las a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, y a-CDR-H3) ocurren en los residuos aminoácidos 31–34 de L1, 50–55 de L2, 89–96 de L3, 31–35B de H1, 50–58 de H2, y 95–102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008).) Salvo que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio hipervariable (por ejemplo, residuos FR) se numeran en la presente de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

Un “inmunoconjugado” es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, con inclusión, a título ilustrativo, de un agente citotóxico.

Un “individuo” o “sujeto” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, a título ilustrativo, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, primates humanos y no humanos, como monos), conejos, y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un humano.

Un “anticuerpo aislado” es uno que ha sido separado de un componente de su ambiente natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo es purificado a más de 95% o 99% de pureza, según lo determinado mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, focalización isoeléctrica (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de fase reversa o intercambio iónico). Para la revisión de los métodos de evaluación de la pureza de anticuerpo, véase, por ejemplo, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79–87 (2007).

Un “ácido nucleico aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que comúnmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosomalmente o en una ubicación cromosomal que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

“Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-mesotelina” se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas livianas y pesadas del anticuerpo (o fragmentos del mismo), con inclusión de dichas moléculas de ácidos nucleico en un solo vector o vectores separados, y dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término “mesotelina”, como se utiliza en la presente, se refiere a mesotelina madura que resulta del procesamiento de una proteína precursora de mesotelina en una célula. El término incluye mesotelina de cualquier fuente de vertebrado, con inclusión de mamíferos, como primates (por ejemplo, humanos y monos cynomolgus) y roedores (por ejemplo ratones y ratas), salvo que se indique de otro modo. El término también abarca variantes que ocurren naturalmente de mesotelina, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una proteína precursora de mesotelina humana ejemplar se muestra en SEQ ID N.º 42, y una mesotelina humana ejemplar se muestra en SEQ ID N.º 43. Otras secuencias de mesotelina ejemplares se describen en la presente.

El término “cáncer positivo para mesotelina” se refiere a cáncer que comprende células que expresan mesotelina en su superficie.

El término “célula positiva para mesotelina” se refiere a una célula que expresa mesotelina en su superficie.

El término "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por anticuerpos variantes posibles, por ejemplo, que contienen mutaciones que ocurren naturalmente o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, dichas variantes generalmente están presente en cantidades menores. Por el contrario a las preparaciones del anticuerpo policlonal, que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos hacia diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal es dirigido hacia una sola determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente

invención pueden realizarse mediante una variedad de técnicas, con inclusión del método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de muestra de fagos, y métodos de utilización de animales transgénicos que contienen todo o parte de las ubicaciones de inmunoglobulina humana, dichos métodos y otros métodos ejemplares para producir anticuerpos monoclonales se describen en la presente.

El término "cáncer positivo para MUC16" se refiere a cáncer que comprende células que expresan MUC16 en su superficie.

El término "célula positiva para MUC16" se refiere a una célula que expresa MUC16 en su superficie.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no se conjuga a una porción heteróloga (por ejemplo, una porción citotóxica) o radiomarcada. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

"Anticuerpos nativos" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que ocurren naturalmente con estructuras variadas. Por ejemplo, anticuerpos de IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que son unidas por disulfuro. De la terminal N a C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguidas de tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3). En forma similar, de la terminal N a C, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también llamada dominio liviano variable o dominio variable de cadena liviana, seguidas por un dominio constante liviano (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto" se utiliza para hacer referencia a las instrucciones que en general se incluyen en los paquetes comerciales de los productos terapéuticos, que contiene información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, luego de la alineación de secuencia y la introducción de los blancos, si es necesario, para

lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando software computacional disponible al público, como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear las secuencias con inclusión de cualquier algoritmo que se necesite para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se están comparando. A los fines de la presente, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código de fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos [*U.S. Copyright Office*], Washington D.C., 20559, donde se registró con el N.º de Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse del código de fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para el uso en un sistema operativo UNIX, con inclusión de UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto de, con, contra una secuencia de aminoácidos dada B (que en forma alternativa puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de, con, contra una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos indicado como coincidencias idénticas mediante el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de

aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con A. Salvo que específicamente se determine lo contrario, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente utilizando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que están en una forma tal que permita la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en el mismo para ser efectivo, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, que no sea un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, a título ilustrativo, un buffer, excipiente, estabilizador, o conservante.

Como se utiliza en la presente, "tratamiento" (y variaciones gramaticales de la misma, como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula a tratarse, y puede llevarse a cabo ya sea por profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos convenientes del tratamiento incluyen, a título ilustrativo, la prevención de la ocurrencia o recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta, prevención de la metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o alivio del estado de enfermedad, y remisión o prognosis mejorada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o aletargar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana de anticuerpo que está involucrada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente posee estructuras similares, con cada dominio que comprende cuatro regiones marco conservadas (FRs) y tres regiones hipervariables (HVRs). (Ver, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6^{ta} ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL solo puede ser suficiente para proporcionar especificidad de unión al antígeno. Asimismo, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que une al

antígeno para tamizar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880–887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624–628 (1991).

El término “vector”, como se utiliza en la presente, hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que ha estado unido. El término incluye el vector con una estructura nucleica de auto replicación así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están operativamente unidos. Dichos vectores se mencionan en la presente como “vectores de expresión”.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en anticuerpos que se unen a mesotelina e inmunoconjugados que comprenden dichos anticuerpos. Los anticuerpos inmunoconjugados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de cánceres positivos para mesotelina.

Anticuerpos Anti-Mesotelina Ejemplares

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a mesotelina. La mesotelina que ocurre naturalmente resulta de la escisión de una proteína precursora de mesotelina en una célula, que genera mesotelina y factor potenciador de megacariocito (MPF), como se muestra en la Figura 1. La mesotelina contiene un truncamiento en la terminal C relativo a la proteína precursora. Dicho truncamiento puede permitir la unión de un ancla GP1. La mesotelina puede permanecer asociada con la superficie celular, por ejemplo, a través de un ancla GPI, o la mesotelina puede liberarse de la célula (por ejemplo, el ancla GPI puede escindirse por una enzima aún no identificada) para producir la mesotelina circulante en un cultivo celular o suero de animal.

Una secuencia de proteína precursora de mesotelina humana que ocurre naturalmente ejemplar se proporciona en SEQ ID N.º: 42, y la secuencia de mesotelina correspondiente se muestra en SEQ ID N.º:43 (correspondientes a los aminoácidos 296–580 de SEQ ID N.º:42). Una secuencia de mesotelina alternativa corresponde a los aminoácidos 296–598 de SEQ ID N.º:42. La SEQ ID N.º:44 es una variante que ocurre naturalmente de SEQ ID N.º:42, del procesamiento de la cual se produce una mesotelina que posee la secuencia de SEQ ID N.º:45. La SEQ ID N.º:45 contiene una inserción de ocho aminoácidos en

el aminoácido 116 relativo a la SEQ ID N.º:43. La forma variante de mesotelina que se muestra en la SEQ ID N.º:45 parece comprende ~5% de las transcripciones de mesotelina en las líneas celulares de tumor.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-mesotelina tiene al menos una o más de las siguientes características, en cualquier combinación:

(a) se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende (i) E153 y D174 o (ii) E211;

(b) presenta o no presenta unión alterada o reducida a diferentes formas glicosiladas de mesotelina;

(c) bloquea o no bloquea la unión de mesotelina a MUC16.

(d) se une a mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM, o alternativamente ≤ 1 nM, o alternativamente $\leq 0,5$ nM, o alternativamente $\leq 0,1$ nM, y opcionalmente $\geq 0,0001$ nM.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, un anticuerpo que no bloquea la unión de mesotelina a MUC16 es un anticuerpo que aumenta la unión de mesotelina a MUC16.

En otra realización, un anticuerpo anti-mesotelina se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E153 y D174. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina además tiene una o más de las siguientes características, en cualquier combinación:

(a) no presenta unión reducida a las formas glicosiladas de mesotelina;

(b) no bloquea la unión de mesotelina a MUC16.

(d) se une a mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM, o alternativamente ≤ 1 nM, o alternativamente $\leq 0,5$ nM, y opcionalmente $\geq 0,0001$ nM.

En dichas realizaciones, un anticuerpo que no bloquea la unión de mesotelina a MUC16 aumenta la unión de mesotelina a MUC16 y/o el anticuerpo se un con una afinidad de ≤ 1 nM. Un anticuerpo ejemplar que posee las características anteriores es 7D9 y variantes humanizadas del mismo, como h7D9.v3, descrito en la presente. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la mesotelina a la que se une un anticuerpo anti-mesotelina es mesotelina humana.

En otra realización, un anticuerpo anti-mesotelina se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E211. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina además tiene una o más de las siguientes características:

(a) no bloquea la unión de mesotelina a MUC16;

(b) se une a mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM, o alternativamente ≤ 1 nM, o alternativamente $\leq 0,5$ nM, y opcionalmente $\geq 0,0001$ nM.

En dichas realizaciones, un anticuerpo que no bloquea la unión de mesotelina a MUC16 aumenta la unión de mesotelina a MUC16 y/o el anticuerpo se une con una afinidad de ≤ 1 nM. Un anticuerpo ejemplar que posee las características anteriores es 22A10 y variantes humanizadas del mismo, como 22A10.v83, descrito en la presente. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la mesotelina a la que se une un anticuerpo anti-mesotelina es mesotelina humana, mesotelina de mono cynomologus, y/o mesotelina de ratas.

En otra realización, un anticuerpo anti-mesotelina:

(a) se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 1–131 de SEQ ID N.º 43;

y

(b) se une a mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM, o alternativamente ≤ 1 nM, o alternativamente $\leq 0,5$ nM, o alternativamente $\leq 0,1$ nM, y opcionalmente $\geq 0,0001$ nM.

En una de dichas realizaciones, el anticuerpo bloquea la unión de mesotelina a MUC16 y/o se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 1–64 o 1–70 de SEQ ID N.º:43. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo desplaza MUC16 unido a mesotelina. Un anticuerpo ejemplar que posee las anteriores características es 19C3, descrito en la presente. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la mesotelina a la que se une un anticuerpo anti-mesotelina es mesotelina humana.

Ensayos

A los fines de determinar si un anticuerpo anti-mesotelina “se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E153 y D174,” o “se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E211,” aquellos residuos que mutan en un polipéptido que comprende SEQ ID N.º:43, y unión del anticuerpo al polipéptido mutado expresado en 293 células se evalúa mediante FACS como se describe en el Ejemplo G, en donde una reducción sustancial ($\geq 70\%$ de reducción) o eliminación de unión del anticuerpo al polipéptido mutado indica que el anticuerpo se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E153 y D174, o que comprende E211.

A los fines de determinar si un anticuerpo anti-mesotelina “no presenta unión reducida a las formas glicosiladas de mesotelina,” la mesotelina humana etiquetadas se expresa en células CHO, se purifica (mediante una etiqueta) y además se separa de acuerdo con la carga en una columna Mono S en fracciones

con glicosilación de mesotelina alta (fracción A11), media (A12), baja (B1) y de baja a ninguna (B5), como se describe en el Ejemplo H. Cada fracción fluye sobre un chip con anticuerpo anti-mesotelina, y los índices de asociación (on) y disociación (off) se miden para cada fracción. Si las afinidades para cada fracción están dentro de 25% entre sí, esto indica que el anticuerpo no presenta unión reducida a las formas glicosiladas de mesotelina.

A los fines de determinar si un anticuerpo anti-mesotelina “bloquea la unión de mesotelina a MUC16”, “no bloquea la unión de mesotelina a MUC 16”, o “aumenta la unión de mesotelina a MUC16”, un ensayo de unión de MUC16 se realiza, de la siguiente manera. Específicamente, un fragmento biotinilado de MUC16 (que abarca tres de las repeticiones de mucina) se incuba con células A431 que expresan de manera estable mesotelina en la presencia o ausencia de anticuerpo anti-mesotelina, y el nivel de unión de MUC16-biotina a células se determina mediante FACS con estreptavidina-PE. El sitio de unión de mesotelina de MUC16 se ha manejado de manera tentativa a los primeros 64 aminoácidos de mesotelina (Kaneko *et al.*, *J. Biol Chem.* 284:3739–49 (2009)). Por el contrario, las células PC3 que expresan de manera estable MUC16 se incuban con mesotelina-his8 purificada (“his8” descrita como SEQ ID N.º: 49) preincubada con anticuerpos anti-mesotelina, y la unión de complejos de anticuerpo mesotelina-his8:purificada a células que expresan MUC16 se detecta mediante FACS utilizando un anticuerpo anti-His6 conjugado Alexa-647 (“His6” descrito como SEQ ID N.º: 50). Si en ninguno de los ensayos anteriores, la señal de FACS es $\geq 50\%$ inferior en la presencia de anticuerpo anti-mesotelina que en la ausencia, entonces ese anticuerpo se considera que bloquea la unión de mesotelina a MUC16. Si en ninguno de los ensayos anteriores, la señal de FACS no disminuye en un $\geq 50\%$ en la presencia de anticuerpo anti-mesotelina, entonces ese anticuerpo se considera que no bloquea la unión de mesotelina a MUC16. Si en ninguno de los ensayos anteriores, la señal de FACS aumenta en la presencia de anticuerpo anti-mesotelina que en la ausencia, entonces ese anticuerpo se considera que aumenta la unión de mesotelina a MUC16.

Si un anticuerpo anti-mesotelina “se une con una afinidad de ≤ 5 nM, o alternativamente ≤ 1 nM, o alternativamente $\leq 0,5$ nM, o alternativamente $\leq 0,1$ nM”, la afinidad se determina de acuerdo con un ensayo Biacore como se describe en la presente en la Sección II.A.1. Específicamente, el K_d se mide mediante el uso de los ensayos de resonancia de plasmón de superficie usando un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C

con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 de unidades de respuesta (RU, por sus siglas en inglés). Brevemente, chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC, por sus siglas en inglés) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno a utilizarse es mesotelina generada y aislada de *E. coli* como se describe en el Ejemplo B. El antígeno se diluye con 10mM de acetato de sodio, pH 4,8, en 5µg/ml (~0,2,2µM) antes de la inyección a una tasa de flujo de 5µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección de antígeno, se inyecta 1M etanolamina para bloquear grupos sin reacción. A los fines de las mediciones cinéticas, diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0,05% polisorbato 20 (TWEEN-20™) surfactante (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (BIACORE® Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de sensorgrama de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865–881 (1999). Si una tasa excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, luego la tasa de asociación puede determinarse mediante una técnica de neutralización fluorescente que aumenta o disminuye la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm pase de banda) a 25°C de un anticuerpo de anti-antígeno de 20nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2 en la presencia de mayores concentraciones de antígeno como se mide en un espectrómetro, como un espectrómetro equipado de detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrómetro 8000-series SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación.

Anticuerpo 7D9 y otras realizaciones

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-mesotelina que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N.º:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N.º:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17; (e) HVR-L2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, o todas las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22. En una realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22, HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos uno dos, o todas las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19. En una realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos uno, al menos dos, o todas las tres secuencias HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N.º:20, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N.º:21, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N.º:22; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o todas las tres secuencias HVR VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID N.º:17, (ii) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N.º:20; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N.º:21; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18; y (f) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, un anticuerpo anti–mesotelina está humanizado. En una realización, un anticuerpo anti–mesotelina comprende las HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y además comprende un marco humano aceptante, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano. En ciertas realizaciones, el marco aceptante humano es el marco consenso kappa I VL (VL_{KI}) humano y/o el marco VH VH_{ATA}, que difiere de I consenso del subgrupo III VH (VH_{III}) humano en 3 posiciones. R71A, N73T, y L78A (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)). En otra realización, un anticuerpo anti–mesotelina comprende las HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y además comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una secuencia FR2 marco de SEQ ID N.º:25 y una secuencia FR3 de SEQ ID N.º:27. En una de dichas realizaciones, el marco de dominio variable de cadena liviana se modifica por un marco consenso kappa I VL (VL_{KI}) humano que posee la secuencia FR2 de SEQ ID N.º:25 y una secuencia FR3 de SEQ ID N.º:27.

En otro aspecto, un anticuerpo anti–mesotelina de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:8. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti–mesotelina que comprende aquella secuencia retiene la capacidad de unirse a mesotelina. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en SEQ ID N.º:8. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en

regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-mesotelina comprende la secuencia VH de SEQ ID N.º:8, con inclusión de modificaciones post-translacionales de aquella secuencia. En una realización particular, el VH comprende una, dos, o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-mesotelina, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4. En ciertas realizaciones, una secuencia VL que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-mesotelina que comprende aquella secuencia retiene la capacidad de unirse a mesotelina. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en SEQ ID N.º:4. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-mesotelina comprende la secuencia VL de SEQ ID N.º:4, con inclusión de modificaciones post-translacionales de aquella secuencia. En una realización particular, el VL comprende una, dos, o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-mesotelina, en donde el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID N.º:8 y SEQ ID N.º:4, respectivamente, con inclusión de modificaciones post-translacionales de aquellas secuencias.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo como un anticuerpo anti-mesotelina proporcionado en la presente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-mesotelina que comprende una

secuencia VH de SEQ ID N.º:8 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:4. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 desde, dentro, o que se superpone a los aminoácidos 152–175. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E153 y D174. En ciertas de dichas realizaciones, el anticuerpo se une a residuos de aminoácidos E153 y D174.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, con inclusión de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-mesotelina es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de sustancialmente longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 u otra clase de anticuerpo o isótopo como se define en la presente.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o en combinación, como se describe en las Secciones 1–7 a continuación:

Anticuerpo 22A10 y otras realizaciones

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-mesotelina que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34; y (f) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, o todas las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39. En una realización, el anticuerpo comprende HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39 y HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

N.º:35. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39, HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, y HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos uno, al menos dos, o todas las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35. En una realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos uno, al menos dos, o todas las tres secuencias HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o todas las tres secuencias HVR VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N.º:35.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, un anticuerpo anti-mesotelina está humanizado. En una realización, un anticuerpo anti-mesotelina comprende HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y además comprende un marco humano aceptante, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano. En ciertas realizaciones, el marco aceptante humano es marco aceptante VL_{KI} y/o VH_{III}.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-mesotelina comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:16. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-mesotelina que comprende aquella secuencia retiene la capacidad de unirse a mesotelina. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en SEQ ID N.º:16. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-mesotelina comprende la secuencia VH de SEQ ID N.º:16, con inclusión de modificaciones post-translacionales de aquella secuencia. En una realización particular, el VH comprende una, dos, o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:38 o 39.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-mesotelina, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:12. En ciertas realizaciones, una secuencia VL que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-mesotelina que comprende aquella secuencia retiene la capacidad de unirse a mesotelina. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en SEQ ID N.º:12. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las

FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-mesotelina comprende la secuencia VL de SEQ ID N.º:12, con inclusión de modificaciones post-translacionales de aquella secuencia. En una realización particular, el VL comprende una, dos, o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-mesotelina, en donde el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID N.º:16 y SEQ ID N.º:12, respectivamente, con inclusión de modificaciones post-translacionales de aquellas secuencias.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo como un anticuerpo anti-mesotelina proporcionado en la presente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-mesotelina que comprende una secuencia VH de SEQ ID N.º:16 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:12. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 desde, dentro, o que se superpone a los aminoácidos 211–327. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E211. En ciertas de dichas realizaciones, el anticuerpo se une al residuo de aminoácidos E211.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, con inclusión de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-mesotelina es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de sustancialmente longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG2a u otra clase de anticuerpo o isótopo como se define en la presente.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o en combinación, como se describe en las Secciones 1–7 a continuación:

Anticuerpo 19C3 y otras realizaciones

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-mesotelina que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis HVR del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. A los fines de la presente sección, las HVR son delineadas por los rangos de aminoácidos correspondientes a las CDR, como se define en la presente.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, o todas las tres secuencias HVR VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En una realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 del anticuerpo producido por hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR-H3, HVR-L3, y HVR-H2 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias HVR VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En una realización, el anticuerpo comprende HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o todas las tres secuencias HVR VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o todas las tres secuencias HVR VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, un anticuerpo anti-mesotelina está humanizado. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo es una forma

humanizada del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En una realización adicional, un anticuerpo anti-mesotelina comprende las HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y además comprende un marco humano aceptante, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-mesotelina comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con el VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-mesotelina que comprende aquella secuencia retiene la capacidad de unirse a mesotelina. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en el VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-mesotelina comprende la secuencia VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464, con inclusión de modificación post-translacionales de aquella secuencia. En una realización particular, el VH comprende una, dos, o tres HVR seleccionadas de HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-mesotelina, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con el VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464. En ciertas realizaciones, una secuencia VL que posee al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-mesotelina que comprende aquella secuencia retiene la capacidad de unirse a mesotelina. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en el VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-

11464. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-mesotelina comprende la secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464, con inclusión de modificación post-translacionales de aquella secuencia. En una realización particular, el VL comprende una, dos, o tres HVR seleccionadas de HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-mesotelina, en donde el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso de ATCC PTA-11464, respectivamente, con inclusión de modificación post-translacionales de aquellas secuencias.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo como un anticuerpo anti-mesotelina proporcionado en la presente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo como el anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el N.º de Acceso PTA-11464.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, con inclusión de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-mesotelina es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de sustancialmente longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG2b u otra clase de anticuerpo o isótopo como se define en la presente.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o en combinación, como se describe en las Secciones 1-7 a continuación:

Afinidad de Anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, o $\leq 0,1$

nM, $\leq 0,01$ nM, o $\leq 0,001$ nM, y opcionalmente es $\geq 10^{-13}$ M. (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, desde 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, desde 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En una realización, el K_d se mide como un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. La afinidad de unión de solución de Fabs para antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de un antígeno no marcado, luego capturar el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865–881(1999)). A los fines de establecer las condiciones para el ensayo, las placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) se cubren durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captación (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6), y posteriormente bloqueado con 2% (p/v) albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no absorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM [^{125}I]-antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593–4599 (1997)). El Fab de interés luego se incuba durante la noche, sin embargo, la incubación puede continuar por un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Luego, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución luego se extrae y la placa se lava ocho veces con 0,1% polisorbato 20 (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 µl/pocillo de centellante (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador TOPCOUNT™ gamma (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos o igual a 20% de unión máxima o menos son elegidas para el uso en ensayos de unión competitivos.

De acuerdo con otra realización, el K_d se mide mediante el uso de los ensayos de resonancia de plasmón de superficie usando un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 de unidades de respuesta (RU). Brevemente, chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El

antígeno se diluye con 10mM de acetato de sodio, pH 4,8, en 5µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una tasa de flujo de 5µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección de antígeno, se inyecta 1M etanolamina para bloquear grupos sin reacción. A los fines de las mediciones cinéticas, diluciones en serie dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0,05% polisorbato 20 (TWEEN-20™) surfactante (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (BIAcore® Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de sensorgrama de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865–881 (1999). Si una tasa de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces la tasa de asociación puede determinarse mediante una técnica de neutralización fluorescente que aumenta o disminuye la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm pase de banda) a 25°C de un anticuerpo de anti-antígeno de 20nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2 en la presencia de mayores concentraciones de antígeno como se mide en un espectómetro, como un espectómetro equipado de detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectómetro 8000-series SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación.

Fragmentos de Anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente constituye un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, a título ilustrativo, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, y scFv y otros fragmentos descriptos a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129–134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York) pp. 269–315 (1994); véase también WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.571.894 y 5.587.458. A los efectos de la discusión de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de salvataje y que han aumentado su vida promedio in vivo, véase la Patente de los Estados Unidos N.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003); y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444–6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena liviana de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 6.248.516 B1).

Se pueden hacer fragmentos de anticuerpos a través de varias técnicas, incluidas, a título ilustrativo, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como también a través de la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), tal como se describe en la presente.

Anticuerpos Humanizados y Quiméricos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente constituye un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N.º. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851–6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “con cambio de clase” en cuyo caso la clase o subclase ha sido modificada de aquella del anticuerpo progenitor. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en humanos, mientras que retienen la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano progenitor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende una o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en

un anticuerpo humanizado son sustituidos con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para hacerlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008), y se describen aún más, por ejemplo, en Riechmann et al., *Nature* 332:323–329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029–10033 (1989); Patente de los Estados Unidos N.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25–34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489–498 (1991) (que describe “resuperficie” (“resurfacing”)); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43–60 (2005) (que describe el “cambio de FR ”); y Osbourn et al., *Methods* 36:61–68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252–260 (2000) (que describe el enfoque de “selección guiada” al cambio de FR).

Las regiones marco humano que pueden utilizarse para la humanización incluyen, a título ilustrativo: regiones de marco seleccionadas mediante el uso del método “mejor ajuste” (véase, por ejemplo, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); las regiones marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada o liviana (véase, por ejemplo, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco humano maduras (somáticamente mutadas) o regiones marco del sello gamético humano (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008)); y regiones marco derivadas de clasificación de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678–10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611–22618 (1996)).

Anticuerpos Humanos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente constituye un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen generalmente en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368–74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450–459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden estar preparados mediante la administración de un inmunogen a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones

variables humanas en respuesta a la prueba de provocación antigénico. Dichos animales contienen típicamente la totalidad o una porción de las ubicaciones de inmunoglobulina humana, que reemplazan a las ubicaciones de inmunoglobulina endógenas, o que se encuentran presente extracromosomáticamente o integradas aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, las ubicaciones de inmunoglobulina endógena han sido generalmente inactivadas. Para la revisión de los métodos para la obtención de anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117–1125 (2005). Véanse, también, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.º 6.075.181 y 6.150.584 descritas en la tecnología XENOMOUSE™; Patente de los Estados Unidos N.º 5.770.429 que describen la tecnología HUMAB®; Patente de los Estados Unidos N.º 7.041.870 que describe la tecnología K–M MOUSE®, y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de los anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden ser modificados aún más, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden hacerse mediante métodos basados en hibridoma. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón–humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos han sido descritas. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, **133**: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, **147**: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados a través de tecnología de hibridoma de célula B humana también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557–3562 (2006). Entre los métodos adicionales se incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales de líneas celulares de hibridomas) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265–268 (2006) (que describen hibridomas humanos – humanos). La tecnología de hibridoma humana (tecnología trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927–937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185–91 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden ser generados mediante el aislamiento de secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de

bibliotecas de muestra de fagos derivados de humanos. Dichas secuencias de dominio variable pueden ser combinadas entonces con el dominio constante humano deseado. Las técnicas para la selección de anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos se describen a continuación.

Anticuerpos Derivados de Bibliotecas

Los anticuerpos de la invención pueden aislarse mediante el análisis de bibliotecas combinatorias de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de métodos son conocidos en la técnica respecto de la generación de bibliotecas de muestra de fagos y el análisis de dichas bibliotecas respecto de los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos son revisados, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen aún más, por ejemplo, en the McCafferty et al., *Nature* 348:552–554; Clackson et al., *Nature* 352: 624–628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581–597 (1992); Marks and Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161–175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299–310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073–1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467–12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1–2): 119–132(2004).

En ciertos métodos de muestra de fagos, los repertorios de genes VH y VL se clonan por separado mediante una reacción de polimerasa en cadena (PCR, por sus siglas en inglés) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fago, que pueden ser analizadas para corroborar el fago de unión al antígeno, tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, **12**: 433–455 (1994). El fago muestra típicamente los fragmentos de anticuerpo, ya sea como fragmentos Fv (scFv) de cadena única o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunogen sin el requerimiento de construcción de hibridomas. De manera alternativa, el repertorio indiferenciado puede ser clonado (por ejemplo, de humano) para proporcionar una fuente única de anticuerpos a una amplia variedad de antígenos *non-self* y también *self* sin inmunización tal como lo describe Griffiths et al., *EMBO J*, **12**: 725–734 (1993). Por último, las bibliotecas indiferenciadas también pueden ser hechas sintéticamente mediante la clonación de segmentos de gen V no redispuestos de células troncales, y mediante el uso de cebadores PCR que contengan una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente

variables y para alcanzar la redistribución *in vitro*, tal como se describe en Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, **227**: 381–388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen las bibliotecas de fago de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: La patente de los Estados Unidos N.º 5.750.373 y las Patentes de los Estados Unidos N.º: 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpo humano se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en la presente.

6. Anticuerpos Multiespecíficos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente constituye un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que poseen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para mesotelina y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos distintos de mesotelina. Los anticuerpos biespecíficos pueden también utilizarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan mesotelina. Los anticuerpos biespecíficos puede prepararse como los anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para hacer anticuerpos multiespecíficos incluyen, a título ilustrativo, la co-expresión recombinante de dos pares de cadena liviana y pesada de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein and Cuello, *Nature* **305**: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* **10**: 3655 (1991)), y la ingeniería de "botón en el ojal" (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden hacerse mediante el diseño de efectos de dirección electrostática para hacer moléculas Fc-heterodiméricas de anticuerpo (WO 2009/089004A1); entrecruzamiento entre dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 4.676.980, y Brennan *et al.*, *Science*, **229**: 81 (1985)); mediante el uso de cierres de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, **148**(5):1547–1553 (1992)); mediante el uso de tecnología "diacuerpo" para hacer fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 90:6444–6448 (1993)); y mediante el uso de cadena única Fv (sFv) dímeros (véase, por ejemplo Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, **152**:5368 (1994)); y mediante la preparación de anticuerpos triespecíficos tal como se describen, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* **147**: 60 (1991).

Los anticuerpos diseñados con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, con inclusión de “anticuerpos pulpo”, se incluyen en la presente (véase, por ejemplo, US2006/0025576A1).

El anticuerpo o el fragmento en la presente también incluye un “FAB de acción dual” o “DAF” que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a mesotelina así como también a otro antígeno diferente (véase, US2008/0069820, por ejemplo).

7. Variantes de Anticuerpos

En ciertas realizaciones, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Toda combinación de supresión, inserción y sustitución puede realizarse para llegar al constructo final, siempre que el constructor final posea las características deseadas, por ejemplo la unión al antígeno.

Variantes de Sustitución, Inserción y Supresión

En ciertas realizaciones, se proporcionan las variantes de anticuerpos que poseen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés de mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 debajo del encabezado “sustituciones preferidas.” Se ofrecen más cambios sustanciales en la Tabla I debajo del encabezado “sustituciones ejemplares” y se describen en más detalle a continuación en referencia a las clases de cadena lateral de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y se pueden monitorear los productos para controlar la actividad deseada, por ejemplo, como la unión al antígeno retenida/ mejorada, la disminución de la

inmunogenicidad, ADCC o CDC mejoradas.

TABLA 1

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutrales: Cys, Ser, Tr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante sustitucional implica la sustitución de uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para su futuro estudio tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) relativas al anticuerpo progenitor y/o habrán retenido sustancialmente ciertas proteínas biológicas del anticuerpo progenitor. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo maduro de afinidad, que puede generarse en forma conveniente, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de maduración de afinidad basada en la muestra de fagos, tales como los que se describen en la presente. Brevemente, uno o más residuos HVR son mutados y los anticuerpos variantes se exhiben y clasifican en un fago para una actividad biológica particular (por ejemplo, la afinidad de unión).

Las alteraciones (por ejemplo, las sustituciones) pueden ser hechas en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones pueden ser hechas con “puntos calientes” (“*hotspots*”) de HVR, a saber, residuos codificados por codones que sufren mutaciones a alta frecuencia durante el proceso de maduración somático (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179–196 (2008)), y/o las SDR (α-CDR), con la variante resultante VH o VL que se testea por la afinidad de unión. La maduración de afinidad mediante la construcción y reselección de bibliotecas secundarias ha sido descrita, por ejemplo, en Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas realizaciones de maduración de afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquier variedad de métodos (por ejemplo, PCR proclive a error, cambio de cadena, o mutagénesis de oligonucleótido direccionada). Se crea una segunda biblioteca. La genoteca se analiza para identificar toda variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica los enfoques dirigidos a HVR, en los que varios residuos de HVR (por ejemplo, 4–6 residuos por vez) son aleatorizados. Los residuos de HVR involucrados en la unión al antígeno pueden ser específicamente identificados, por ejemplo, mediante el uso de modelado o mutagénesis de escaneo de alanina. Generalmente se dirigen a CDR–H3 y CDR–L3 en particular.

En ciertas realizaciones, las sustituciones, las inserciones o las supresiones pueden ocurrir dentro de uno o más HVRs siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unión al antígeno. Por ejemplo, las alteraciones conservadoras (por ejemplo, las sustituciones conservadoras tal como se proporcionan en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión pueden hacerse en las HVR. Dichas alteraciones pueden ser fuera de los "puntos calientes" de HVR o las SDR. En ciertas realizaciones de las secuencias VH y VL variante proporcionadas anteriormente, cada HVR se ve ya sea no alterada, o contiene no más de uno, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil de identificación de ciertos residuos o regiones de un anticuerpo que puede dirigirse para mutagénesis se llama "mutagénesis de escaneo de alanina" tal como se describe en Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081–1085. En este método, se identifica un residuo o grupo de residuos blanco (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan con un aminoácido neutral o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir más sustituciones en las ubicaciones de aminoácidos lo que demuestra la sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. En forma alternativa, o adicionalmente, una estructura de cristal del complejo del antígeno–anticuerpo se utiliza para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los residuos vecinos pueden ser dirigidos o eliminados como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden analizar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de terminales de amino– y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como también inserciones de intrasecuencias de residuos de aminoácidos múltiples o únicos. Se incluyen entre los ejemplos de inserciones de terminal un anticuerpo con un residuo metionilo de terminal N. Otras variantes insercionales de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión al terminal N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida promedio del suero del anticuerpo.

Variantes de glicosilación

En ciertas realizaciones, se altera un anticuerpo proporcionado en la presente para aumentar o disminuir el alcance en el que el anticuerpo es glicosilado. La adición o supresión de sitios de glicosilación al anticuerpo se obtiene convenientemente mediante la alteración de la secuencia del aminoácido de manera que uno o más de los sitios de glicosilación se crean o remueven.

En donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede ser alterado. Los anticuerpos nativos producidos por las células mamíferas comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente se acopla mediante una unión N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15:26–32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, glucosamina N–acetilo (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como también una fucosa acoplada a un GlcNAc en la “raíz” de una estructura de un oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención a fin de crear variantes del anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, las variantes de anticuerpos se ofrecen si se tiene una estructura de carbohidrato que no posee fucosa unida (en forma directa o indirecta) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de 1% a 80%, de 1% a 65%, de 5% a 65% o de 20% a 40%. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar a Asn297, relativa a la suma de la totalidad de glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras de manosa altas, híbridas y complejas) según las mediciones de espectrometría de masa MALDI–TOF, tal como ha sido descrito en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 hace referencia al residuo de asparagina ubicado alrededor de la posición 297 en la región Fc (Numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ser ubicado a alrededor de ± 3 aminoácidos en ascenso o disminución de la posición 297, a saber, entre posiciones 294 y 300, debido a las variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación han mejorado la función ADCC. Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos N°. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones que se refieren a variantes de anticuerpos “defucosilados” o “sin fucosa” incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US

2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239–1249 (2004); Yamane–Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533–545 (1986); Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares knockout como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células knockout CHO (véase, por ejemplo, Yamane–Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680–688 (2006); y WO2003/085107).

Se proveen más variantes de anticuerpos con oligosacáridos divididos en dos, por ejemplo, en los cuales un oligosacárido biantenarico unido a una región Fc del anticuerpo se encuentra dividido en dos por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden haber reducido la fucosilación y/o mejorado la función de ADCC— Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878 (Jean–Mairet *et al.*); Patente de los Estados Unidos N.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan las variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden haber mejorado la función de CDC. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

Variantes de región Fc

En ciertas realizaciones, una o más modificaciones de aminoácidos pueden ser introducidas en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente, y de ese modo se genera una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, las cuales la hacen un candidato deseable para aplicaciones en las que la vida promedio del anticuerpo

in vivo es importante, sin embargo ciertas funciones efectoras (como el complemento y ADCC) son innecesarias o nocivas. En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* pueden realizarse para confirmar la reducción/depleción de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión de receptor de Fc (FcR) pueden realizarse para asegurarse de que el anticuerpo no posee capacidad de unión de Fc γ R (por lo tanto asimismo no poseen actividad ADCC), pero mantiene la capacidad de unión de FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan Fc(sólo RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión FcR sobre las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457–492 (1991). Se describen ejemplos ilustrativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I., et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059–7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499–1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351–1361 (1987)). En forma alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y CytoTox 96® ensayo de citotoxicidad no radioactivo (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células periféricas mononucleares de sangre (PBMC) y células asesinas naturales (NK). En forma alternativa o, adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se desarrolla en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652–656 (1998). Los ensayos de unión C1q pueden también realizarse para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, C1q y C3c de unión a ELISA en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo CDC (véase, por ejemplo, Gazzano–Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045–1052 (2003); y Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738–2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y vida promedio/limpieza mediante los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759–1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los Estados Unidos N.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante Fc llamado "DANA" con sustitución de residuos 265 y 297 a alanina (Patente de los Estados Unidos N.º 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcRs. (Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591–6604 (2001).)

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos EU).

En algunas realizaciones, las alteraciones se hacen en la región Fc que resulta en unión de C1q alterado (es decir, ya sea mejorado o disminuido) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N.º 6.194.551, WO 99/51642, y Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178–4184 (2000).

Los anticuerpos con aumento de vidas promedio y una mejora de la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), responsable de la transferencia de los IgGs maternos al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos consisten en una región Fc con una o más sustituciones que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en una o más residuos de regiones Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, una sustitución de residuo de región Fc 434 (Patente de los Estados Unidos N.º 7.371.826).

Véase también Duncan & Winter, *Nature* 322:738–40 (1988); Patente de los Estados Unidos N.º 5.648.260; Patente de los Estados Unidos N.º 5.624.821; y WO 94/29351 respecto de otros ejemplos de variantes de región Fc.

Variantes de anticuerpo diseñados con cisteína

En ciertas realizaciones, puede ser conveniente crear anticuerpos diseñados con cisteína, por ejemplo, "tioMAbs," en los cuales uno o más residuos

de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, los grupos de tiol reactivos se posicionan en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo a otras porciones, como porciones de fármacos o porciones de drogas de enlace, para crear un inmunoconjugado, como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, uno o más de los siguientes residuos pueden sustituirse por cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden ser generados como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N.º 7.521.541.

Derivados de Anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente puede además modificarse para contener porciones no proteicas adicionales conocidas en la técnica y fácilmente disponibles. Las porciones idóneas para la derivatización del anticuerpo incluyen, a título ilustrativo, polímeros solubles en agua. Los ejemplos ilustrativos de polímeros solubles en agua incluyen, a título ejemplificativo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de anhídrido maléico/etileno, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o glicol de poli(n-vinil pirrolidona)polietileno, homopolímeros de propilenglicol, óxido de prolipropileno/copolímeros de óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y sus mezclas. El propionaldehído de polietilenglicol puede presentar ventajas en la producción debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, pueden ser las mismas o diferentes moléculas. En general, la cantidad y/o tipo de polímeros que se utiliza para la derivatización puede determinarse sobre la base de consideraciones que incluyen, entre otras, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado del anticuerpo se va a utilizar en una terapia con condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proveen los conjugados de un anticuerpo y las porciones no proteicas que pueden calentarse en forma selectiva mediante la

exposición a radiación. En una realización, la porción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600–11605 (2005)). La radiación puede tener cualquier longitud de onda, e incluye, a título ilustrativo, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que calientan la porción no proteica a una temperatura a la cual las células cercanas a la porción no proteica del anticuerpo mueren.

Composiciones y Métodos Recombinantes

Los anticuerpos pueden producirse mediante el uso de composiciones y métodos recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N.º 4.816.567. En una realización, se proporciona el ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-mesotelina descrito en la presente. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas livianas y / o pesadas del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, los vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula huésped comprende (por ejemplo, ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, la célula de Ovario de Hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés), (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método de hacer un anticuerpo anti-mesotelina, en donde el método comprenden el cultivo de una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tal como se proporcionó más arriba, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente la recuperación del anticuerpo de la célula huésped (o el medio de cultivo de célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-mesotelina, se aísla el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, por ejemplo, tal como se describe

anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para su posterior clonación y/ o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se aísla y secuencia fácilmente mediante los procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores de codificación de anticuerpo incluyen células procariotas o eucariotas descritas en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacteria, en particular cuando no se necesita la función efectora Fc y la glicosilación. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245–254, sobre la descripción de la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Luego de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse aún más.

Además de las procariotas, los microbios eucariotas, como los hongos filamentosos o levadura son adecuados para la clonación o expresión de huéspedes para los vectores que codifican el anticuerpo, con inclusión de cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación han sido “humanizadas” que resultan en la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación humano completa o parcialmente. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409–1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210–215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células invertebradas incluyen células de plantas e insectos. Varias células baculovirales se han identificado que se utilizan junto con las células de insectos, particularmente, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también pueden utilizarse como huéspedes. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

La células de vertebrados también pueden utilizarse como huéspedes. Por ejemplo, las líneas de células mamíferas que se adaptan a crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionaria humana (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK); células sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243–251 (1980); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44–68 (1982); células MRC 5 ; y células FS4. Otras células huésped útiles de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), con inclusión de células DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de célula de mieloma, como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares huésped de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo., Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255–268 (2003).

Ensayos

Los anticuerpos anti-mesotelina proporcionados en la presente puede ser identificados, clasificados o caracterizados según sus propiedades físicas/ química y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se prueba para su capacidad de unión al antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos como ELISA, FACS o Western blot.

En otro aspecto, los ensayos de competición pueden utilizarse para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente para la unión a mesotelina. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo de competición se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une mediante un anticuerpo descrito en la presente. Los métodos ejemplares detallados para el mapeo de un epítipo al que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competición ejemplar, la mesotelina se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a mesotelina (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente) y un segundo anticuerpo no marcado que se prueba para su capacidad de competir con el primer anticuerpo para la unión de mesotelina. El segundo anticuerpo puede estar presente en un supernatante de hibridoma. Como control, la mesotelina inmovilizada se incuba en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Luego de la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a mesotelina, se elimina el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con la mesotelina. Si la cantidad de marcador asociado con mesotelina inmovilizada es sustancialmente reducida en la muestra de prueba relativa a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo compete con el primer anticuerpo para la unión a mesotelina. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Inmunoconjugados

La invención asimismo proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-mesotelina conjugado en la presente con uno o más agentes citotóxicos, como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores de crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteínas, toxinas activas enzimáticamente de origen bacterial, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos del mismo), o isótopos radioactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, con inclusión, a título ilustrativo, de un maitansinoide (véanse las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1); una auristina, como porciones de fármaco de monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de los mismos (véanse las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336–3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925–2928 (1998)); una antraciclina, como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477–523 (2006); Jeffrey

et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358–362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717–721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829–834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529–1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336–4343 (2002); y Patente de los Estados Unidos N.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano, como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en la presente conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento del mismo, con inclusión a título ilustrativo, de la cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteína americana Pitolaca (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en la presente conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radioactivos están disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para los estudios escintigráficos, por ejemplo tc99m o I123, o un marcador spin para la imagen de resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como imagen de resonancia magnética, mri), como iodina-123 nuevamente, iodina-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico pueden realizarse mediante la utilización de una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometil) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocinatos (como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activo (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede

prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido triaminpentaacético de 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno rotulado marcado Carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de un agente quelante para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase WO94/11026. La unión puede ser una "unión escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse una unión de ácido lábil, unión sensible a peptidasa, unión fotolábil, unión de dimetilo o unión que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos N.º 5.208.020).

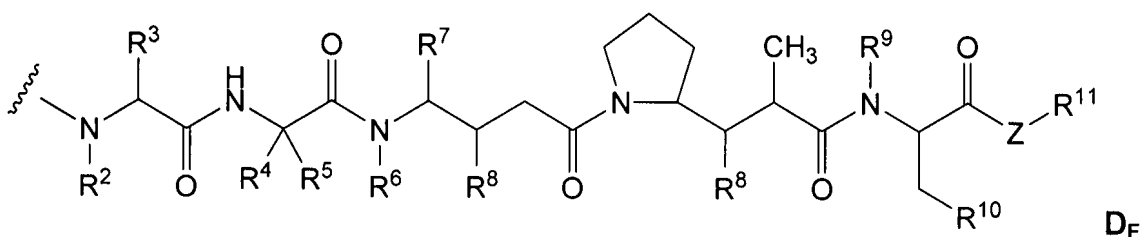
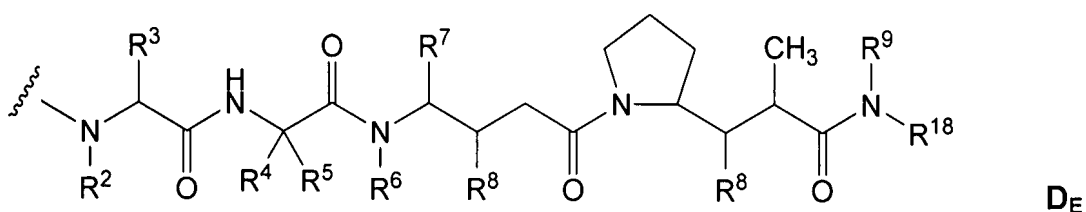
Los inmuno conjugados o ADC en la presente expresamente contemplan, a título ilustrativo, aquellos conjugados preparados con reactivos e entrecruzamiento con inclusión, a título ilustrativo, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran disponibles en los comercios (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Inmunoconjugados que Comprenden Auristinas y Dolastatinas

En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a dolastatina o un análogo peptídico de dolastatina o derivado, por ejemplo, una auristatina (Patentes de los Estados Unidos N.º 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis GTP, y división nuclear y celular (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemoter.* 45(12):3580-3584) y poseen actividad anticancerígena (Patente de los Estados Unidos N.º 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). La porción de fármaco de dolastatina o auristatina puede acoplarse al anticuerpo a través de terminales N (amino) o la terminal C (carboxilo) de la porción de fármaco peptídica (WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina ejemplares incluyen la terminal unida a porciones de fármaco de monometilauristatina DE y DF. (Véanse las Patentes de los Estados Unidos N.º 7.659.241, 7.498.298 y 7.745.394.)

Una porción de fármaco peptídica puede seleccionarse de las Fórmulas D_E y D_F a continuación:



en donde la línea ondeada de D_E y D_F indica el sitio de unión covalente a un anticuerpo o componente de unión al anticuerpo, e independientemente en cada ubicación.

R^2 se selecciona de H y alquilo C_1-C_8 ;

R^3 se selecciona de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil C_1-C_8 -arilo, alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 se selecciona de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil C_1-C_8 -arilo, alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^5 se selecciona de H y metilo;

o R^4 y R^5 juntos forman un anillo carbocíclico y poseen la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en donde R^a y R^b son independientemente seleccionados de H, alquilo C_1-C_8 y carbociclo C_3-C_8 y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6;

R^6 se selecciona de H y alquilo C_1-C_8 ;

R^7 se selecciona de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil C_1-C_8 -arilo, alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 es independientemente seleccionado de H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 y O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 se selecciona de H y alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} se selecciona de arilo o heterociclo C_3-C_8 ;

Z es O, S, NH, o NR^{12} , en donde R^{12} es alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} se selecciona de H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-$, R^{14} , o $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m es un entero que varía desde 1-1000;

R^{13} es alquilo C_2-C_8 ;

R^{14} es H o alquilo C_1-C_8 ;

cada ocurrencia de R^{15} es independientemente H, $COOH$, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, o $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocurrencia de R^{16} es independientemente H, alquilo C_1-C_8 , o $-(CH_2)_n-COOH$;

R^{18} se selecciona de $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C_3-C_8), y $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C_3-C_8); y

n es un entero que varía desde 0 a 6.

En una realización, R^3 , R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo y R^5 es $-H$ o metilo. En una realización ejemplar, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es $-H$, y R^7 es sec-butilo.

En incluso otra realización, R^2 y R^6 son cada uno metilo, y R^9 es $-H$.

En incluso otra realización, cada ocurrencia de R^8 es $-OCH_3$.

En una realización ejemplar, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es $-H$, R^7 es sec-butilo, cada ocurrencia de R^8 es $-OCH_3$, y R^9 es $-H$.

En una realización, Z es $-O-$ o $-NH-$.

En una realización, R^{10} es arilo.

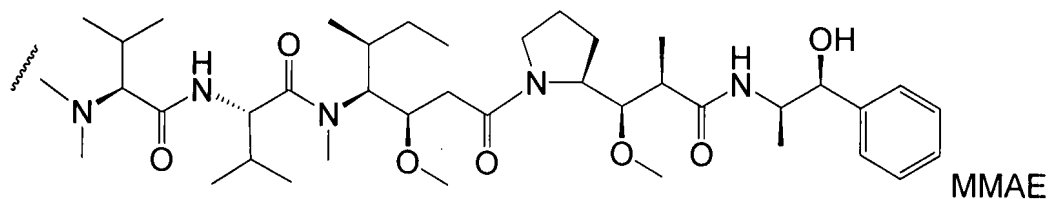
En una realización ejemplar, R^{10} es $-fenilo$.

En una realización ejemplar, cuando Z es $-O-$, R^{11} es $-H$, metilo o t-butilo.

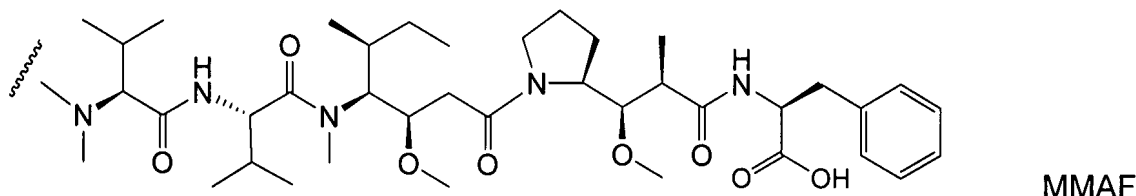
En una realización, cuando Z es $-NH$, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, en donde R^{15} es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, y R^{16} es $-alquilo C_1-C_8$ o $-(CH_2)_n-COOH$.

En otra realización, cuando Z es $-NH$, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, en donde R^{15} es $-(CH_2)_n-SO_3H$.

Una realización de auristatina ejemplar de la fórmula D_E es MMAE (monometil auristatina E), en donde la línea ondeada indica la unión covalente a una unión de un conjugado anticuerpo-fármaco:

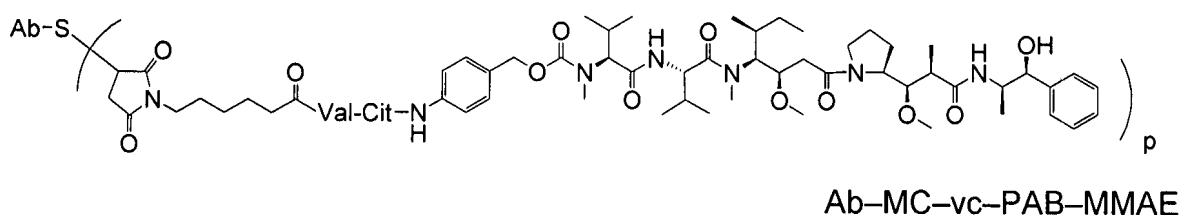
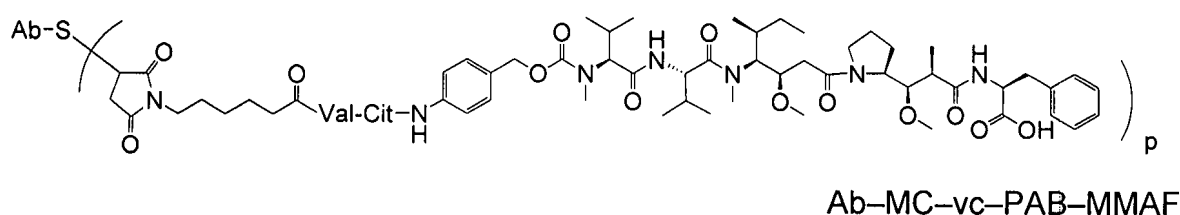


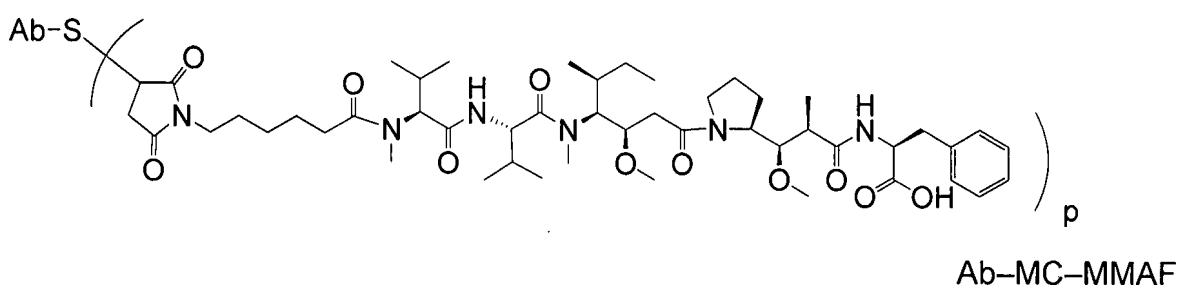
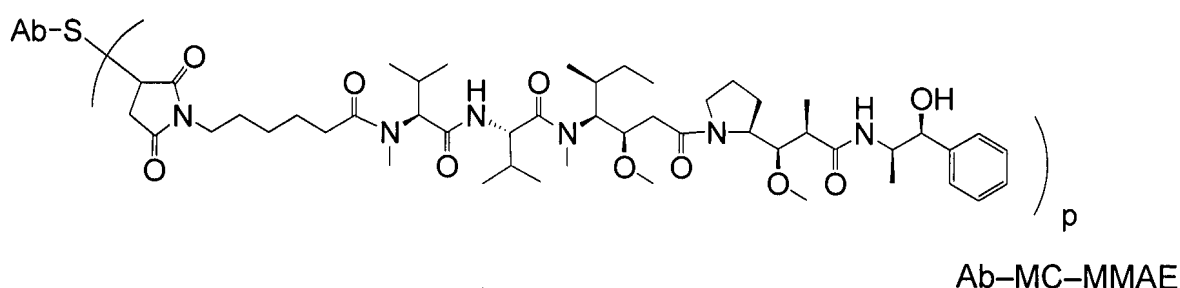
Una realización de auristatina ejemplar de la fórmula D_F es MMAF (monometil auristatina F, una variante de auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en la terminal C del fármaco), en donde la línea ondeada indica la unión covalente a una unión de un conjugado de anticuerpo-fármaco (véase US 2005/0238649 y Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114–124):



En un aspecto, los grupos hidrofílicos con inclusión a título ilustrativo de ésteres de trietilenglicol (TEG), como se muestra anteriormente, pueden unirse a una porción de fármaco en R¹¹. Sin estar ligados a ninguna teoría particular, los grupos hidrofílicos ayudan en la internalización y no aglomeración de una porción de fármaco.

Las realizaciones ejemplares de ADC que comprenden auristatina/dolastatina o derivados de los mismos se describe en US 2005/0238649 A1 y Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114–124, que se incorpora expresamente a la presente a modo de referencia. Las realizaciones ejemplares de ADC que comprenden MMAE o MMAF y varios componentes de unión tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en donde “Ab” es un anticuerpo; p es la carga de fármaco (número promedio de porciones de fármaco por anticuerpo) y varía desde aproximadamente 1 a aproximadamente 8; “vc” es “val-cit,” es decir, un dipéptido de valina-citrulina; y “S” es un átomo de azufre:





Las realizaciones ejemplares de ADCs que comprende MMAF y varios componentes de unión además incluyen Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. En forma interesante, los inmunoconjugados que comprenden MMAF unidos a un anticuerpo mediante una unión que no es proteolíticamente escindible ha mostrado poseer actividad comparable a inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante una unión proteolíticamente escindible. Véase, Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114–124. En dichos casos, se cree que la liberación de droga se efectúa mediante degradación de anticuerpo en la célula. *Id*

En forma típica, las porciones de fármaco en base a péptidos pueden prepararse mediante la formación de una unión de péptido entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichas uniones de péptidos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo al método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, Págs. 76–136, 1965, Academic Press) el cual es muy conocido en el área de la química de péptidos. La porciones de fármaco de auristatina/ dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: US 2005/0238649 A1; Patente de los Estados Unidos N.º 5635483; Patente de los Estados Unidos N.º 5780588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463–5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243–277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719–725; y Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859–863; y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778–784. +

En particular, las porciones de fármaco de auristatina/ dolastatina de la fórmula D_F, como MMAF y derivados de las mismas, pueden prepararse utilizando

métodos descritos en US 2005/0238649 A1 y Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114–124. Las porciones de fármaco de auristatina/dolastatina de la fórmula D_E, como MMAE y derivados de las mismas, pueden prepararse utilizando los métodos descritos en Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778–784. Las porciones de unión de fármaco MC–MMAF, MC–MMAE, MC–vc–PAB–MMAF, y MC–vc–PAB–MMAE pueden sintetizarse de manera conveniente mediante métodos rutinarios, por ejemplo, como se describe en Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778–784, y la Publicación de Solicitud de Patente N.º US 2005/0238649 A1, y luego se conjugan con un anticuerpo de interés.

Métodos y Composiciones para el Diagnóstico y la Detección

En ciertas realizaciones, todo anticuerpo anti–mesotelina proporcionado en la presente es útil para la detección de la presencia de mesotelina en una muestra biológica. El término “detectar” como se utiliza en la presente abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una “muestra biológica” comprende, por ejemplo, una célula o tejido (por ejemplo, material de biopsia, con inclusión de tejido cancerígeno pancreático potencialmente cancerígeno, de ovarios, de pulmón, o endometrial, o mesotelioma), o suero.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti–mesotelina para el uso en un método del diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para la detección de la presencia de mesotelina en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti–mesotelina como se describe en la presente en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti–mesotelina a mesotelina, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti–mesotelina y mesotelina en la muestra biológica. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se utiliza un anticuerpo anti–mesotelina para seleccionar sujetos idóneos para la terapia con un anticuerpo anti–mesotelina, por ejemplo, donde la mesotelina es un biomarcador para la selección de pacientes. En una realización adicional, la muestra biológica es suero, por ejemplo, en donde se detecta la mesotelina se ha circulado de célula cancerígenas al suero.

En una realización adicional, se utiliza un anticuerpo anti–mesotelina *in vivo* para detectar, por ejemplo, mediante imagen *in vivo*, un cáncer positivo para mesotelina en un sujeto, por ejemplo, a los fines de diagnosticar, pronosticar, cáncer de estadificación, determinar el curso adecuado de terapia, o monitorear la respuesta de un cáncer a la terapia. Un método conocidos en la técnica para la

detección in vivo es una tomografía de emisión de inmuno-positrones (inmuno-PET), como se describe, por ejemplo, en van Dongen et al., *The Oncologist* 12:1379–1389 (2007) y Verel et al., *J. Nucl. Med.* 44:1271–1281 (2003). En dichas realizaciones, se proporciona un método para la detección de un cáncer positivo para mesotelina en un sujeto, el método que comprende administrar un anticuerpo anti-mesotelina marcado a un sujeto que padece o se sospecha que padece un cáncer positivo para mesotelina, y detectar el anticuerpo anti-mesotelina marcado en el sujeto, en donde la detección del anticuerpo anti-mesotelina marcado indica un cáncer positivo para mesotelina en el sujeto. En ciertas de dichas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina macado comprende un anticuerpo anti-mesotelina conjugado a un emisor de positrones, como ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr , y ^{124}I . En una realización particular, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

En realizaciones adicionales, un método de diagnóstico o detección comprende poner en contacto un primer anticuerpo anti-mesotelina inmovilizado a un sustrato con una muestra biológica a ser evaluada para la presencia de mesotelina, exponer el sustrato a un segundo anticuerpo anti-mesotelina, y detectar si el segundo anticuerpo anti-mesotelina está unido a un complejo entre el primer anticuerpo anti-mesotelina y mesotelina en la muestra biológica. Un sustrato puede ser cualquier medio de apoyo, por ejemplo, vidrio, metal, cerámica, perlas poliméricas, portaobjetos, chips y otros sustratos. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido (por ejemplo, material de biopsia, con inclusión de tejido cancerígeno o pancreático potencialmente cancerígeno, de ovarios, de pulmón, o endometrial, o mesotelioma), o suero, es decir, suero en el que ha circulado mesotelina. En ciertas realizaciones, el primer y segundo anticuerpo anti-mesotelina es cualquiera de los anticuerpos descriptos en la presente. En dichas realizaciones, el segundo anticuerpo anti-mesotelina puede ser 19C3 o anticuerpos derivados de 19C3 como se describe en la presente.

Los trastornos ejemplares que pueden ser diagnosticados o detectados de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen cánceres positivos para mesotelina, como cáncer pancreático positivo para mesotelina (con inclusión adenocarcinoma ductal pancreático), cáncer de ovarios positivo para mesotelina (con inclusión de adenocarcinoma sérico de ovarios), cáncer de pulmón positivo para mesotelina (con inclusión de carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NSCLC)), mesotelioma, y cáncer endometrial positivo para mesotelina. En una

realización, un cáncer positivo para mesotelina es un cáncer que recibe un puntaje de inmunohistoquímica (IHC) anti-mesotelina mayor que "0," que corresponde a muy débil o sin tinción en >90% de las células tumorales, en las condiciones descritas en la presente en el Ejemplo J. En otra realización, un cáncer positivo para mesotelina en un nivel 1+, 2+ o 3+, como se define en la condiciones descritas en la presente en el Ejemplo J. Un cáncer positivo para mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un cáncer positivo dual.

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-mesotelina marcados. Los marcadores incluyen, a título ilustrativo, marcadores o porciones que son detectadas directamente (como marcadores fluorescentes, cromofóricos, electrón-denso, quimiluminiscentes y radioactivos), así como porciones, como enzimas o ligandos, que son detectados indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, a título ilustrativo, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de las luciérnagas y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindiones, peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasa de sacarida, por ejemplo, oxidasa de glucosa, oxidasa de galactosa, y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y oxidasa de xantina, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, rótulos de spin, rótulos de bacteriófago, radicales libres estables, y similares. En otra realización, un marcador es un emisor de positrones. Los emisores de positrones incluyen, a título ilustrativo, a ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr , y ^{124}I . En una realización particular, un emisor de positrones es ^{89}Zr .

Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-mesotelina o inmunoconjugado como se describe en la presente se preparan mediante la mezcla de dicho anticuerpo o inmunoconjugado que posee el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la

forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para el recipiente en dosis y concentraciones empleados e incluyen, a título ilustrativo: buffers como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; conservadores (como el cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol fenílico, butílico o bencílico; alquil parabenos como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 residuos aproximadamente); proteínas, como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como la polivinilpirrolidona; aminoácidos como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen la glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como la sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra iones formadores de sal como el sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o surfactantes no iónicos como polietilenglicol (PEG). Los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares en la presente además incluyen agentes de dispersión de fármacos intersticiales, como glicoproteínas de hialuronidasa activa neutral soluble (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertos sHASEGPs ejemplares y métodos de uso, con inclusión de rHuPH20, se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, un sHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales, como condroitinasas.

Las formulaciones de inmunoconjugado o anticuerpo liofilizado ejemplares se describen en la Patente de los Estados Unidos N.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuoso o inmunoconjugado incluyen aquellas descritas en la Patente de los Estados Unidos N.º 6.171.586 y WO2006/044908, las últimas formulaciones incluyen un buffer de histidina-acetato.

La formulación en la presente pueden también contener más de un ingrediente activo, tal como sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan en forma adversa al otro. Por ejemplo, puede ser conveniente además proporcionar gemcitabina, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer positivo para mesotelina, como cáncer pancreático positivo para mesotelina (adenocarcinoma pancreático). En otro ejemplo, puede ser conveniente además proporciona un

anticuerpo anti-MUC16 conjugado con un agente citotóxico, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer positivo para mesotelina o cáncer positivo dual, como cáncer de ovarios positivo para mesotelina (adenocarcinoma sérico de ovarios) o cáncer de ovarios positivo dual. Dichos ingredientes activos se encuentran presentes de manera adecuada en combinación en forma adecuada en cantidades que son efectivas para el propósito deseado.

Los ingredientes activos pueden capturarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, sistema de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^o edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Pueden realizarse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos idóneos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunoconjugado, cuyas matrices se encuentran en forma de artículos formados, por ejemplo, films, o microcápsulas.

Las formulaciones que se utilizarán para la administración in vivo son generalmente estériles. La esterilidad se obtiene fácilmente, por ejemplo, mediante la filtración a través de las membranas de filtración estériles.

Composiciones y Métodos Terapéuticos

Cualquiera de los anticuerpos anti-mesotelina o inmunoconjugados proporcionados en la presente pueden ser utilizados en los métodos, por ejemplo, métodos terapéuticos.

En un aspecto, un inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina proporcionado en la presente se utiliza en un método de inhibición de proliferación de una célula positiva para mesotelina, el método que comprende exponer la célula a inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina en condiciones que permitan la unión de inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina a mesotelina sobre la superficie de la célula, de este modo, se inhibe la proliferación de la célula. En ciertas realizaciones, el método es un método in vitro o in vivo. En realizaciones adicionales, la célula es pancreática, de ovarios, de pulmón,

mesotelioma o célula endometrial. En realizaciones adicionales, la célula es una célula dual-positiva.

La inhibición de la proliferación celular in vitro puede probarse utilizando el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo™, que está disponible en el comercio de Promega (Madison, WI). El ensayo determina el número de células viables en el cultivo basado en la cuantificación de ATP presente, lo que constituye una indicación de las células activas metabólicamente. Véase, Crouch et al. (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81–88, Patente de los Estados Unidos N.º 6602677. El ensayo puede realizarse en formato de 96 o 384 pocillos, lo que lo hace adecuado para la clasificación de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés) automática. Véase, Cree et al. (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398–404. El procedimiento de ensayo implica agregar un olo reactivo (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a células cultivadas. Esto produce la lises celular y la generación de una señal luminiscente producida por una reacción de luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Los datos pueden registrarse por el luminómetro o dispositivo de imagen de cámara CCD. La salida de luminiscencia se expresa como unidades de luz relativas (RLU, por sus siglas en inglés).

En otro aspecto, se proporciona un inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina para el uso como un medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina para el uso en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, se proporciona un inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina para el uso en el tratamiento de cáncer positivo para mesotelina. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina para el uso en un método de tratamiento de un individuo que padece cáncer positivo para mesotelina, el método que comprende la administración a un individuo de una cantidad efectiva de inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina. En una de dichas realizaciones, el método además comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutica adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina en la producción o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de un cáncer positivo para mesotelina. En una realización adicional, el medicamento es

para el uso en un método de tratamiento de cáncer positivo para mesotelina, el método que comprende la administración a individuo que padece cáncer positivo para mesotelina de una cantidad efectiva del medicamento. En una de dichas realizaciones, el método además comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un cáncer positivo para mesotelina. En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padece dicho cáncer positivo para meotelina de una cantidad efectiva de inmunoconjugado o anticuerpo anti-mesotelina. En una de dichas realizaciones, el método además comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación.

Un cáncer positivo para mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser, por ejemplo, cáncer pancreático positivo para mesotelina (con inclusión adenocarcinoma ductal pancreático), cáncer de ovarios positivo para mesotelina (con inclusión de adenocarcinoma sérico de ovarios), cáncer de pulmón positivo para mesotelina (con inclusión de carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NSCLC)), mesotelioma, y cáncer endometrial positivo para mesotelina. En una realización, un cáncer positivo para mesotelina es un cáncer que recibe un puntaje de inmunohistoquímica (IHC) anti-mesotelina mayor que "0," que corresponde a muy débil o sin tinción en >90% de las células tumorales, en las condiciones descriptas en la presente en el Ejemplo J. En otra realización, un cáncer positivo para mesotelina en un nivel 1+, 2+ o 3+, como se define en la condiciones descriptas en la presente en el Ejemplo J. Un cáncer positivo para mesotelina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un cáncer positivo dual.

Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-mesotelina o inmunoconjugado en la presente, por ejemplo, para el uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-mesotelina o inmunoconjugados proporcionados en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica

comprende cualquiera de los anticuerpos anti-mesotelina o inmunoconjugados proporcionados en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden utilizarse ya sea solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede ser coadministrado con al menos un agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es gemcitabina. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-MUC16 conjugado a un agente citotóxico.

Dichas terapias de combinación que se nombraron con anterioridad incluyen la administración combinada (en donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas formulaciones o separadas), y la administración por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede ocurrir en forma previa, simultáneamente y/o luego de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden también utilizarse en combinación con la terapia de radiación.

Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse mediante los medios idóneos, con la inclusión de la administración parenteral, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parentales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Las dosis pueden aplicarse mediante cualquier vía idónea, por ejemplo, mediante inyecciones, como inyecciones intravenosas o subcutáneas, lo cual depende en parte de si la administración es breve o crónica. Los diversos esquemas de dosificación incluyen, a título ilustrativo, una o varias administraciones en diversos puntos de tiempo, la administración por bolo, y la infusión por pulso se contemplan en la presente.

Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se formularán, dosificarán y administrarán en un modo coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores de consideración en este contexto incluyen el desorden específico que se trate, el mamífero específico que se trate, la condición clínica del paciente, la causa del desorden, el sitio de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración, y otros factores conocidos por los practicantes médicos. No es necesario, pero opcionalmente el anticuerpo o

inmunoconjugado puede formularse con uno o más agentes que se utilizan en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores que se explicaron con anterioridad. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis o vías de administración que se describen en el presente, o alrededor de 1 al 99% de las dosis que se describen en la presente, o en cualquier dosis o vía que se considere apropiada en términos empíricos/clínicos.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, el tipo de anticuerpo o inmunoconjugado, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunoconjugado se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado y el criterio de médico que lo trate. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra en forma apropiada al paciente una sola vez o en una serie de tratamientos. De acuerdo al tipo y la gravedad de la enfermedad, alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg –10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial posible para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante la infusión continua. Una dosis diaria típica varía de desde 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg aproximadamente o más, de acuerdo a los factores que se mencionaron con anterioridad. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, según la afección, el tratamiento se mantendrá en general hasta que ocurra la eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosis del anticuerpo o inmunoconjugado puede encontrarse en el rango de 0,05 mg/kg a 10 mg/kg aproximadamente. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 4,0 mg/kg o 10 mg/kg aproximadamente (o una combinación de ellas). Dichas dosis pueden administrarse en forma intermitente, por ejemplo, cada una semana o cada tres semanas (por ejemplo, aquella que recibe un paciente de dos a veinte, o por ejemplo, seis dosis de anticuerpo aproximadamente). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores puede llevarse a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención y un anticuerpo anti-mesotelina.

Artículos de Producción

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de producción que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los desordenes descritos anteriormente. El artículo de producción comprende un contenedor y una etiqueta o un prospecto en el contenedor o asociado con el mismo. Los contenedores idóneos incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los contenedores se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor posee una composición que es efectiva por sí misma, o combinada con otra composición(es) para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico del trastorno y pueden tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la afección específica. Aún más, el artículo de producción puede comprender (a) un primer contenedor con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención; y (b) un segundo contenedor con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende además otro agente citotóxico o de otro modo agente terapéutico. El artículo de producción en la presente realización de la invención puede también comprender un prospecto que indica las composiciones que se pueden utilizar para tratar una afección particular. En forma alternativa, o adicional, el artículo de producción puede también comprender un segundo (o tercer) contenedor que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyecciones (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina regulada con fosfato, solución Ringer o solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales que pueden ser convenientes para el comerciante y el usuario, con la inclusión de buffers, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Depósito de Material Biológico

El siguiente material biológico ha sido depositado con la Colección de Cultivos Tipo Americana (*American Type Culture Collection*, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110–2209, USA (ATCC):

Designación de Hibridoma	ATCC N.º	Fecha de Depósito
MPF:3542 (19C3.1.2)	PTA–11464	9 de noviembre de 2010

El hibridoma depositado anteriormente mencionado produce el anticuerpo 19C3 mencionado en la presente.

El depósito se ha realizado de conformidad con las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del procedimiento de Patentes y las Disposiciones en el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha de depósito y durante al menos (5) años luego de la solicitud más reciente para presentar una muestra del depósito. El depósito estará disponible en la ATCC en virtud de los términos del Tratado de Budapest, y con sujeción a un acuerdo entre Genentech, Inc., y la ATCC, que asegura que todas las restricciones impuestas por el depositante sobre la disponibilidad al público del material depositado serán irrevocablemente eliminadas al momento de la concesión de la patente de los Estados Unidos correspondiente, asegura la disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito al público al momento de la emisión de la patente de los Estados Unidos correspondiente o al momento de presentar al público de cualquier solicitud de patente extranjera o de los Estados unidos, cualquiera surja primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados Unidos con derecho a la misma de acuerdo con 35 U.S.C. § 122 y las regulaciones del Comisionado de acuerdo con la misma (con inclusión de 37 C.F.R. § 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden practicar varias otras realizaciones, dada la descripción general provista con anterioridad.

Expresión Génica de Mesotelina Humana

La expresión génica de mesotelina humana se analizó utilizando una base de datos adecuada que contiene la información de expresión génica (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD). El análisis gráfico de la base de datos de GeneExpress® se realizó utilizando un visor de perfil de micromatrices. La Figura 2 es una representación gráfica de la expresión génica de mesotelina humana en varios tejidos, que se enumeran a la izquierda. La escala a lo largo de la parte superior del gráfico indica los niveles de expresión génica en base a la intensidad de señal de hibridación. Los puntos aparecen ambos arriba y debajo de la línea adyacente a cada tejido enumerado. Los puntos que aparecen sobre la línea representan la expresión génica en el tejido normal, y los puntos que aparecen debajo de la línea representan la expresión génica en un tumor y tejido enfermo. La Figura 2 muestra mayor expresión génica de mesotelina en ciertos tejidos de tumor o enfermos relativos a sus contrapartes normales. En particular, la mesotelina muestra una sobreexpresión sustancial en tumores de ovarios, pancreáticos, endometriales y de pulmón, con inclusión de adenocarcinomas y mesoteliomas. La expresión de mesotelina humana está esencialmente ausente en tejidos normales excepto para el mesotelio normal (peritoneo, pericardio y pleura).

Generación de Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales contra la mesotelina humana se generaron utilizando los siguientes procedimientos. Ya sea MPF:mesotelina humana (aminoácidos 34–580 de SEQ ID N.º:42) o mesotelina humana (SEQ ID N.º:43, correspondiente a los aminoácidos 296–580 de SEQ ID N.º:42), cada una fusionada a una terminal N unizima His (HQ)–marcador, se expresó en *E.Coli* 58F3 y purificó en una columna Ni–NTA (Qiagen), seguida de la filtración por gel en una columna Superdex 200 en 20mM MES pH 6,0, 6M GdnHCl como se describió previamente (Kirchhofer *et al.*, 2003) y diálisis en 1mM HCl para el almacenamiento a –80°C.

Cinco ratones Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) se hiperinmunizaron seis veces con una mezcla 2 µg de dos antígenos en adyuvante Ribi (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO).

Los dos mejores ratones se eligieron en base a titulaciones e anticuerpo de alta afinidad dirigidas por ELISA y sus células B se agruparon y fusionaron con células de mieloma de ratón (X63.Ag8.653; Colección de Cultivos Tipo Americana,

Manassas, VA) usando un protocolo análogo a uno previamente descrito (Koehler and Milstein, 1975; Hongo *et al.*, 1995). Luego de 10–12 días, los supernatantes se cosecharon e hibridomas y se clasificaron para su unión a ambos antígenos (en forma separada) por ELISA directo. A lo fines de verificar el reconocimiento de mesotelina expresada en superficie celular glicosilada adecuadamente plegada, los supernatantes positivos para ELISA se clasificaron más mediante FACS en células SVT2 transfectadas con gD–mesotelina (gD es un marcado de epítipo terminal N utilizado como un control positivo con anticuerpos anti–gD). Los hibridomas positivos se sibclonaron dos veces mediante la dilución limitante y once se aumentaron en escala y los anticuerpos purificados mediante cromatografía de proteína A.

La Figura 3 muestra los anticuerpos monoclonales aislados, junto con ciertas propiedades a ser descriptas en más detalle a continuación.

Humanización de 7D9 y 22A10

Los anticuerpos monoclonales 7D9 y 22A10 se humanizaron tal como se describe a continuación. Los números de residuos son de acuerdo a Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5ta Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Humanización de 7D9

Clonación de los dominios variables de 7D9 murino

El ARN total se extrajo de las células del hibridoma lo cual produjo 7D9 murino mediante la utilización de métodos estándar. Los dominios variables livianos (VL) y variables pesados (VH) se amplificaron mediante la utilización de RT–PCR con cebadores de degeneración a las cadenas pesadas y livianas. Los cebadores directos fueron específicos para la secuencia de aminoácidos de terminal N de las regiones de VL y VH. Respectivamente, los cebadores indirectos de la LC y HC se diseñaron para hibridar una región en el dominio constante liviano (CL) y el dominio constante pesado 1 (CH1), los cuales se conservan altamente a lo largo de las especies. La secuencia de polinucleótidos de las inserciones se determinó mediante la utilización de métodos de secuenciación de rutina. Las secuencias de aminoácidos de VL y VH de 7D9 se muestran en las Figuras 4 y 5, respectivamente.

Injertos de la región hipervariable directa en el marco de consenso humano aceptante

Las variantes creadas durante la humanización de 7D9 se evaluaron en la forma de una IgG. Los dominios de VL y VH del murino 7D9 se alinearon con las secuencias de consenso del kappa I (VL_{KI}) humano de VL y el subgrupo III (VH_{III}) humano de VH. Las regiones hipervariables del anticuerpo murino 7D9 (mu7D9) se diseñaron en marcos aceptantes de VL_{KI} y VH_{ATA} para generar 7D9.v1. El marco de VH aceptante VH_{ATA}, difiere de VH_{III} en 3 posiciones: R71A, N73T, y L78A (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)). Del dominio VL mu7D9, las posiciones 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3) se injertaron en VL_{KI}. Del el dominio VH mu7D9, las posiciones 26–35 (H1), 49–65 (H2) y 95–102 (H3) se injertaron en VH_{ATA} (Figuras 1 y 2). Estas definiciones de CDR incluyen las posiciones definidas por la hipervariabilidad de su secuencia (Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970)), su ubicación estructural (Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987)) y su implicación en los contactos de antígeno–anticuerpo (MacCallum *et al. J. Mol. Biol.* 262: 732–745 (1996)).

El injerto directo, 7D9.v1, se generó mediante la mutagénesis de Kunkel mediante la utilización de un oligonucléotido separado para cada región hipervariable. Se añadieron tres oligonucleótidos fosforilados para la cadena pesada o la cadena liviana a una plantilla de 571 ng Kunkel en 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂ en un volumen final de 40 µl. La mezcla se hibridó a 90 °C durante 2 min, 50 °C durante 5 min y luego se enfrió en hielo. Luego se llenó una plantilla de 10 µl hibridada mediante la adición de 0,5 µl 100 mM ATP, 0,5 µl 25 mM dNTPs (25 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl 100 mM DTT, 1 µl 10X TM buffer (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 80 U T4 ligasa, y 4 U T7 polimerasa en un volumen total de 13,6 µl durante 2 horas a temperatura ambiente. 10 µl del producto ligado y con el que se rellenó luego se transformó en células azules XL1 (Stratagene). Los clones correctos se identificaron mediante el secuenciamiento de ADN y se expresaron como una IgG.

Evaluación de variantes

Las variantes de 7D9 se expresaron como IgG mediante la transfección transitoria de CHO. IgG se purificaron con cromatografía por afinidad de la proteína G. La afinidad de cada variante 7D9 IgG para la mesotelina humana se determinó mediante la resonancia de plasmones de superficie mediante la utilización de un BIAcore™–2000. Se inmovilizaron Chips CM5 de grado de investigación Biacore con aproximadamente 110 RU de mesotelina humana recombinante derivada de *E. coli* mediante la utilización del kit de acoplamiento de

amina de Biacore. Se inyectaron diluciones dobles en serie de cada variante de 7D9 (0,488 a 1000 nM en PBS con 0,05% Tween 20) a una tasa de velocidad de 30 μ l/min. Cada muestra se analizó con una asociación de 5 minutos y disociación de 3,5 minutos. Luego de cada inyección se regeneró el chip mediante la utilización de 10 mM Glicina pH 1,7. La respuesta de unión se corrigió mediante la sustracción de RU de un flujo celular con una IgG irrelevante inmovilizada a una densidad similar. Se utilizó un modelo 1:1 Langmuir de ajuste simultáneo de k_{on} and k_{off} para el análisis de cinética.

Resultados

El marco aceptante humano utilizado para la humanización de 7D9 se basa en el consenso I kappa VL humano (VL_{KI}) y el marco VH aceptante VH_{ATA}, que difiere del consenso III del subgrupo VH humano (VH_{III}) en 3 posiciones: R71A, N73T, y L78A (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)). Los dominios VL y VH del murino 7D9 se alinearon con los dominios VL_{KI} y VH_{III} humanos; las regiones hipervariables se identificaron y se injertaron en el marco aceptante humano para generar 7D9.v1 (Figuras 4 y 5). Como una IgG, la afinidad de 7D9.v1 se reduce ~2 veces en relación a mu7D9 (formateado como un 7D9 quimérico) tal como se evalúa mediante Biacore (Figure 6).

Para mejorar la afinidad de unión de 7D9.v1, las posiciones 36 y 87 en la cadena liviana y las posiciones de 48, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78 y 80 en la cadena pesada se cambiaron a residuos encontrados en estas posiciones en mu7D9. Las combinaciones de estas cadenas livianas y pesadas alteradas con cadenas de 7D9.v1 se transfectaron en CHO, expresados como IgG y purificados, y evaluados para la unión a la mesotelina humana mediante Biacore (Figure 6).

Las variantes 7D9.v2 y 7D9.v3, las cuales contienen la cadena liviana alterada, tenían una afinidad comparable al 7D9 quimérico. La variante 7D9.v3 difiere de 7D9.v1 en 2 posiciones en la cadena liviana. Ninguno de los cambios solo fue suficiente para mejorar la unión comparable a aquella de mu7D9 (Figura 6).

Resumen de los cambios para el 7D9.v3 humanizado: Las 6 CDRs del murino 7D9 (definido como las posiciones 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3), 26–35 (H1), 49–65 (H2) y 93–102 (H3)) se injertaron en los dominios aceptantes VL_{KI} y VH_{ATA} del consenso humano. Dos residuos de marco adicionales, 36 y 87 de la cadena liviana se cambiaron a residuos de murino, lo cual condujo a 7D9.v3 con una afinidad comparable a mu7D9.

Humanización de 22A10

Clonación de los dominios variables del murino 22A10

Se extrajo el ARN total de las células del hibridoma lo cual produjo murino 22A10 mediante la utilización de métodos estándar. Los dominios livianos variables (VL) y pesados variables (VH) se amplificaron mediante la utilización de RT-PCR con cebadores de degeneración a la cadena pesada (HC) y cadena liviana (LC). Los cebadores directos fueron específicos para la secuencia de aminoácidos de terminal N de las regiones VL y VH. Respectivamente, los cebadores indirectos de LC y HC se diseñaron para hibridar una región en el dominio liviano constante (CL) y el dominio 1 pesado constante (CH1), los cuales se conservan altamente a lo largo de las especies. La secuencia de polinucleótidos de los injertos se determinó mediante la utilización de métodos de secuenciamiento de rutina. Las secuencias de aminoácidos VL y VH 22A10 se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente.

Injertos de la región hipervariable directa en el marco de consenso humano aceptante

Las variantes creadas durante la humanización de 22A10 se evaluaron en la forma de una IgG o se exhibieron en forma monovalente como Fab en fagos. Este fagémido utilizado para este trabajo era un vector de muestra Fab-g3 monovalente, que consta de dos marcos de lectura abiertos bajo el control de un único promotor phoA. El primer marco de lectura abierto consta de la secuencia de señal stII fusionada a los dominios VL y CH1 de la cadena liviana aceptante, y el segundo consta de la secuencia de señal stII fusionada a los dominios VH y CH1 de la cadena pesada aceptante seguido de la proteína cobertura de fago menor P3.

Los dominios VL y VH del murino 22A10 se alinearon con las secuencias de consenso de kappa I (VL_{KI}) VL humano y el subgrupo III (VH_{III}) VH humano. Las regiones hipervariables del anticuerpo murino 22A10 (mu22A10) se diseñaron en marcos aceptantes VL_{KI} y VH_{III} para generar el injerto 22A10. Del dominio VL de mu22A10, las posiciones 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3) se injertaron en VL_{KI}. Del dominio VH de mu22A10, las posiciones 26–35 (H1), 49–65 (H2) y 95–102 (H3) se injertaron en VH_{III} (Figuras 7 y 8). Estas definiciones de CDR incluyen posiciones definidas por la hipervariabilidad de su secuencia (Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970)), su ubicación estructural (Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987)) y su

implicación en contactos antígeno–anticuerpo (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732–745 (1996)).

El injerto 22A10 se generó mediante la mutagénesis de Kunkel mediante la utilización de un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Se añadieron tres oligonucleótidos fosforilados para la cadena pesada o la cadena liviana a una plantilla 571 ng Kunkel en 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂ en un volumen final de 40 µl. La mezcla se hibridó a 90°C durante 2 min, 50°C durante 5 min y luego se enfrió sobre hielo. Una plantilla de 10 µl hibridada luego se llenó mediante la adición de 0,5 µl 100 mM ATP, 0,5 µl 25 mM dNTPs (25 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl 100 mM DTT, 1 µl 10X TM buffer (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 80 U T4 ligasa, y 4 U T7 polimerasa en un volumen total de 13,6 µl durante 2 horas a temperatura ambiente. 10 µl del producto ligado y con el que se rellenó luego se transformó en células azules XL1 (Stratagene). Los clones correctos se identificaron mediante el secuenciamiento de ADN y se expresaron como una IgG.

Aleatorización suave de las regiones hipervariables

El injerto 22A10 se maduró por afinidad mediante una estrategia de aleatorización suave. La diversidad de secuencia se introdujo por separado en cada región hipervariable de modo que se mantuvo una tendencia hacia la secuencia de la región hipervariable del murino mediante la utilización de una estrategia de síntesis de oligonucleótidos envenenados (Gallop et al., *J Med Chem* 37:1233–51 (1994)). Para cada posición diversificada, el codón que codifica el aminoácido de tipo salvaje se envenena con una mezcla 70–10–10–10 de nucleótidos que resulta en una tasa promedio de mutación del 50 por ciento en cada posición. La diversidad de secuencia se introdujo en las regiones hipervariables del injerto 22A10 mediante la mutagénesis de Kunkel para generar seis bibliotecas de fagos aleatorizadas suaves que se ordenaron por separado. Se crearon seis bibliotecas y cada una constaba de una región única hipervariable aleatorizada suave.

Generación de bibliotecas de fagos

Los oligonucleótidos diseñados para introducir diversidad en cada región hipervariable se fosforilaron por separado en reacciones de 20 µl que contenían 660 ng de oligonucleótido, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 mM DTT, y quinasa de polinucleótido 5 U durante 1 h a 37°C.

Para cada biblioteca, se añadió 2 µl de oligonucleótido fosforilado a una plantilla 300 ng de Kunkel en 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂ en un volumen final de 10 µl. La mezcla se hibridó a 90 °C durante 2 min, 50 °C durante 5 min y luego se enfrió sobre hielo. La plantilla hibridada luego se llenó mediante la adición de 0,5 µl 10 mM ATP, 0,5 µl 10 mM dNTPs (10 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl 100 mM DTT, 1 µl 10X TM buffer (0,5 M Tris pH 7.5, 0,1 M MgCl₂), 80 U T4 ligasa, y 4 U T7 polimerasa en un volumen total de 20 µl durante 2 horas a temperatura ambiente. Estos productos ligados y con los cuales se rellenó fueron cada uno transformados en células azules XL1, se cultivaron en 0,5 ml de 2YT con 5 µg/ml de tetraciclina y el fago de ayuda M13/KO7 (MOI 10) durante 2 hr a 37 °C y luego se agruparon y transfirieron a 500 ml 2YT con 50 µg/ml carbenacilin y se cultivaron 16 h a 37 °C.

Selecciones de Fagos

Para las selecciones de fagos de fase sólida, se inmovilizó mesotelina humana derivada de 293 o de mono cynomolgus en 50 mM de bicarbonato de sodio pH 9.6 en placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc, Rochester, NY) durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon durante al menos 1 hora mediante la utilización de Casein Blocker (Pierce, Rockford, IL).

Los fagos se extrajeron del sobrenadante del cultivo y se suspendieron en PBS con 5 % de leche en polvo y 0,05 % de Tween 20 (PBSBT). Luego de la adición de la biblioteca de fagos y una incubación de 1 hora, se lavaron los pocillos de microtitulación en forma extensa con PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBST) y los fagos unidos se eluyeron mediante la incubación de los pocillos con 20 mM HCl, 500 mM KCl durante 30 minutos. Los fagos que se eluyeron se neutralizaron con 1 M Tris, pH 8 y se amplificaron mediante la utilización de células azules XL1 y el fago de ayuda M13/KO7 y se cultivaron durante la noche a 37 °C en 2YT, 50 µg/ml carbencilin. Las titulaciones de los fagos que se eluyeron de un pocillo que contenía el blanco se compararon con las titulaciones de los fagos que se recuperaron de un pocillo que no contenía el blanco para evaluar el enriquecimiento.

Para las selecciones de fagos de la fase de solución, se añadió mesotelina humana derivada de 293 biotinilada o de mono cynomolgus biotinilada a fagos suspendidos en PBS con 5% de leche en polvo y 0,05 % de Tween 20 (PBSBT). Luego de la incubación, los fagos unidos a la mesotelina biotinilada se capturaron en una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina durante 5 minutos.

Los pocillos de microtitulación se lavaron en forma extensa con PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBST) y los fagos unidos se eluyeron mediante la incubación de los pocillos con 20 mM HCl, 500 mM KCl durante 30 minutos. Los fagos que se eluyeron se neutralizaron con 1 M Tris, pH 8 y se amplificaron mediante la utilización de células azules XL1 y el fago de ayuda M13/KO7 y se cultivaron durante la noche a 37 °C en 2YT, 50 µg/ml carbencilin. Las titulaciones de los fagos que se eluyeron de los pocillos que contenían el blanco se compararon con las titulaciones de los fagos recuperados de un pocillo que no contenía el blanco para evaluar el enriquecimiento.

Para las selecciones de fagos de la fase de solución, el rigor de la selección se aumentó en forma gradual mediante la captura de fagos que se unieron a concentraciones decrecientes de mesotelina biotinilada en la solución seguido de la captura en neutravin durante 10 minutos (selección por tasa de asociación) y mediante el aumento del tiempo de lavado y la temperatura para permitir que los fagos de unión débiles se retiren (selección por tasa de disociación) (Fuh et al., *J. Mol. Biol.* 340:1073–1093 (2004)).

Producción de IgG

A los fines de la selección, se produjeron en forma inicial variantes de IgG en células 293. Los vectores que codificaban a VL y VH (25 µg) se transfectaron en células 293 mediante la utilización del sistema FUGENE (Roche, Basel, Switzerland). 500 µl de FuGene se mezclaron con 4,5 ml de medios DMEM sin FBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cada cadena (25 µg) se añadió a esta mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se transfirió a cinco matraces T–150 para la transfección durante la noche a 37 °C en 5% de CO₂. Al día siguiente, los medios que contenían la mezcla de transfección se extrajeron y se reemplazaron con 23 ml de medios PS04 con 0,1 ml/L elementos de rastro (A0934) y 10 mg/L insulina (A0940). Las células se incubaron durante 5 días adicionales luego de los cuales los medios se extrajeron a 1000 rpm durante 5 minutos y se esterilizaron por filtración mediante la utilización de un filtro de baja unión a las proteínas de 0,22 µm. Las muestras pudieron almacenarse a 4°C luego de la adición de 2,5 ml 0,1% de PMSF por cada 125 ml de medios. IgG se purificó con cromatografía por afinidad de la proteína G.

Determinaciones de afinidad

La afinidad de las variantes de 22A10 IgG para la mesotelina humana o de mono cynomolgus se determinó mediante la resonancia de plasmones de superficie mediante la utilización de un BIAcore™-2000. Se inmovilizaron chips CM5 de grado de investigación Biacore con aproximadamente 110 RU de mesotelina humana recombinante derivada de *E. coli* o de mono cynomolgus mediante la utilización del kit de acoplamiento de amina de Biacore. Diluciones dobles en serie de cada variante de 22A10 (0,488 a 1000 nM en PBS con 0,05% de Tween 20) se inyectaron a una tasa de velocidad de 30 μ l/min. Cada muestra se analizó con asociación de 5 minutos y disociación de 3,5 minutos. Luego de cada inyección, el chip se regeneró mediante la utilización de 10 mM Glicina pH 1.7. La respuesta de unión se corrigió mediante la sustracción de RU de una célula de flujo con una IgG irrelevante inmovilizada a una densidad similar. Se utilizó un modelo 1:1 Langmuir de ajuste simultáneo de k_{on} y k_{off} para el análisis de cinética.

Resultados

El marco aceptante humano utilizado para la humanización de 22A10 se basó en el dominio VL kappa I humano de consenso y el dominio VH del subgrupo humano de consenso. Los dominios VL y VH de mu22A10 se alinearon con los dominios del kappa I humano y del subgrupo III; cada región determinante de la complementariedad (CDR) se identificó e injertó en el marco aceptante humano para generar un injerto de CDR que pudiera expresarse como una IgG o exhibirse como un Fab en fagos (Figuras 7 y 8).

Se generaron seis bibliotecas de aleatorización suave en las que se introdujo la diversidad en forma separada en cada CDR del injerto de la CDR de 22A10. Las bibliotecas se sometieron a adsorción contra la mesotelina humana o de mono cynomolgus (derivada de células 293, con el objetivo de mejorar la unión a formas glicosiladas de mesotelina de mono cynomolgus o de humano) mediante la utilización de estrategias de clasificación de solución y de fase sólida. El método de clasificación de la solución permite seleccionar clones de alta afinidad a través de la manipulación del tiempo de la concentración biotinilada blanco y de la captura de fagos mientras que la adición de blanco no etiquetado puede utilizarse para eliminar clones con tasas de disociación más rápidas (Fuh et al. *J. Mol. Biol.* 340:1073–1093 (2004)). Los clones de la última ronda para cada biblioteca se seleccionaron para el análisis de la secuencia de ADN y revelaron cambios en la secuencia dirigidos a cada CDR excepto CDR-L2 y CDR-H2, lo cual sugiere

muchas variaciones posibles para mejorar la unión al antígeno. Varios clones seleccionados de la mesotelina humana o de mono cynomolgus tenían cambios en CDR-H3, y el más abundante con un cambio de tirosina a isoleucina en la posición 99. Esta variante, junto con varias otras, se expresó como una IgG y se caracterizó por unirse a la mesotelina mediante Biacore y mediante el análisis de Scatchard (Figura 9A). Varios clones excedieron la afinidad del injerto de 22A10.

Las variantes 22A10 humanizadas se utilizaron para inmunoprecipitar la mesotelina de una línea celular que expresa mesotelina en forma estable. Las células BJAB que expresaron en forma estable mesotelina etiquetada con gD de diferentes especies se inmunoprecipitaron con las variantes 22A10 humanizadas, tal como se muestra en la Figura 9B (Gr, injerto; v1 (1), v17 (17) y v83 (83)) o el control negativo de h7D9.v3, h5B6 anti-gD o hIgG para la comparación. Los inmunoprecipitados se lavaron y se sometieron al método Western blot con anticuerpos anti-gD de murino para detectar gD-mesotelina. h22A10.v83 fue la mejor de las variantes de h22A10 en su habilidad de inmunoprecipitar las tres especies de mesotelina (mono cynomolgus, blot superior; humano, blot medio; y rata, blot inferior). La senda más a la derecha muestra 20% de lisato de entrada (sin inmunoprecipitación) para la comparación de los niveles de expresión totales. Los marcadores de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda.

Resumen de los cambios para el 22A10.v83 humanizado: Comenzamos por un injerto de las seis CDRs de murino 22A10 CDRs (definidas como las posiciones 24–34 (L1), 50–56 (L2), 89–97 (L3), 26–35 (H1), 49–65 (H2) y 95–102 (H3)) en el VL de Kappa I de consenso humano y el VH del subgrupo III, y se utilizó la aleatorización suave de CDR para identificar un cambio en CDR H3 (Y99I) que mejoraba la unión a la mesotelina humana y de mono cynomolgus. 22A10.v83 mostró una unión de afinidad alta y también mostró la habilidad de reconocer más sitios de unión, relativos a las otras variantes humanizadas.

A lo largo de esta aplicación, se hace referencia a los anticuerpos monoclonales de ratón 7D9 y 22A10 en la alternativa como 7D9, m7D9 o mu7D9; y 22A10, m22A10 o mu22A10, respectivamente. Se hace referencia a los anticuerpos monoclonales humanizados 7D9.v3 y 22A10.v83 en la alternativa como 7D9.v3, h7D9.v3 o hu7D9.v3; y 22A10.v83, h22A10.v83 o hu22A10.v83, respectivamente, a menos que se indique de otro modo.

Reactividad cruzada de especies

Se examinaron los anticuerpos monoclonales a fin de determinar si reaccionan en forma cruzada con la mesotelina de especies distintas a la humana. La Figura 11 muestra la homología de secuencias entre la mesotelina humana (SEQ ID N.º:43), del mono cynomolgus (SEQ ID N.º:46), de rata (SEQ ID N.º:47) y ratón (SEQ ID N.º:48). Los residuos sombreados son idénticos entre al menos dos especies. Los residuos no sombreados difieren entre al menos dos de las cuatro especies. La Figura 12 muestra los resultados del análisis FACS de las células 293 transfectadas en forma estable con mesotelina etiquetada con epítipo gD (mesotelina humana, de cino, rata o ratón); teñidas con 10 µg/ml h7D9.v3, h22A10.v83 o anti-gD h5B6; y detectadas con el anticuerpo anti-humano Alexa 647. Las células 293 no transfectadas no expresan normalmente la mesotelina ("WT"). h7D9.v3 es específico para la mesotelina humana, mientras que h22A10.v83 se une a la mesotelina humana, de cino y de rata, pero no a la mesotelina de ratón. La tinción anti-gD verificó que efectivamente la mesotelina de ratón se expresó.

Afinidades del Anticuerpo

A fin de determinar las afinidades de unión relativa de h7D9.v3 y h22A10.v83, se llevó a cabo el análisis de Scatchard mediante el seguimiento de procedimientos estándar (Holmes et al., *Science* 256:1205–1210 (1992)), brevemente por medio de la incubación de las células desprendidas con h7D9.v3 etiquetado con [125] o h22A10.v83 durante 2 horas a temperatura ambiente en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo no etiquetado, y el lavado y cuantificación de la radioactividad unida a las células mediante el conteo por cintilación. Los datos se analizaron con ajuste de curvas por regresión no lineal en el programa New Ligand (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) para estimar los valores Kd (Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107 220–239 (1980)).

Tal como se muestra en la Figura 13, h7D9.v3 se unió a la mesotelina humana etiquetada con gD expresada en las líneas celulares 293 transfectadas en forma estable, BJAB y HT1080 (las cuales no expresan mesotelina endógena) con afinidades de 0,2, 0,25 y 0,97 nM, respectivamente. Estos valores Kd abarcan el rango observado para la mesotelina endógena en cuatro líneas celulares pancreáticas y dos líneas celulares ováricas (0,41–1 nM). Las afinidades h22A10.v83 para la mesotelina humana expresada en las mismas líneas celulares estables fueron 2,7, 1,8 y 6,2 nM respectivamente, de acuerdo con su afinidad para la mesotelina humana endógena (~9–10 nM). h22A10.v83 se unió a la

mesotelina de rata expresada en las células 293 transfectadas en forma estable y las células BJAB con afinidades de 7,3 nM y 2,7 nM, respectivamente, que se encuentra en línea con el Kd de 6,2 nM que se observó para la mesotelina de rata endógena en una línea celular pleural normal, 4/4–RM4 (Aronson et al., *In Vitro* 17: 61–70 (1981)).

Grupos de Epítomos

A fin de determinar si 7D9 y 22A10 comparten el mismo epítopo como otros anticuerpos anti-mesotelina que se listan en la Figura 3, se llevó a cabo el mapeo de epítomos de los anticuerpos monoclonales, mediante un ELISA estándar de bloqueo cruzado. Se cubrieron noventa y seis placas Nunc Immunosorp (Nalge Nunc, USA) durante la noche a 4°C con 100 µL de 1 µg/mL dominio extracelular de mesotelina humana en buffer de cobertura (50 mM carbonato de sodio, pH 9.5). Todos los pasos siguientes se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Luego de lavar tres veces en 200 µL buffer de lavado (PBS con 0,05% de Tween 20, pH 7.4), las placas se bloquearon con buffer de ELISA (PBS con 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,05% de Tween 20, pH 7.4) durante 60 minutos. Los anticuerpos monoclonales 7D9 o 22A10 de murino luego se añadieron a 20 µg/mL en buffer de ELISA durante 2 horas (100 µL por pocillo). Sin lavar, también se añadieron versiones biotiniladas de todos los anticuerpos anti-mesotelina de prueba (100 µL de 2 µg/mL) a una concentración final de 1 µg/mL durante 30 minutos. Luego de lavar tres veces en 200 µL de buffer de lavado, se detectó toda unión de anticuerpos biotinilados mediante la adición de estreptavidina–peroxidasa de rábano picante (HRP) (Zymed; Carlsbad, CA) a una dilución de 1:5000 durante 30 minutos. Luego de tres lavados al igual que con anterioridad, se añadió 100 µL de sustrato cromogénico de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (BioFX Laboratories; Owings Mills, MD) durante 5 minutos. La reacción cromogénica se terminó mediante la adición de 100 µL de reactivo de detención (BioFX Laboratories), y la absorbancia se leyó a 620 nm en un Ultramicroplate Reader (Biotek Instruments; Winooski, VT). La extensión máxima de la unión posible de cada uno de los anticuerpos biotinilados se determinó en paralelo por medio de su incubación con mesotelina en ausencia de los anticuerpos 7D9 y 22A10 no biotinilados.

Los resultados se muestran en la Figura 14. Una señal por parte de cualquiera de los nueve anticuerpos anti-mesotelina biotinilados (*) indica la falta

de competencia para el primer anticuerpo (la unión máxima por parte de cada anticuerpo biotinilado en ausencia del primer anticuerpo para la comparación se muestra en el grupo de la derecha). 7D9 (al cual se hace referencia como 7D9.5.2 en la Figura 14) es el único anticuerpo que no puede unirse cuando 7D9 está presente (es decir, compete con sí mismo, segunda barra desde la izquierda), mientras que 22A10 (al cual se hace referencia como 22A10.1.2 en la Figura 14) se une normalmente (barra negra en el grupo izquierdo). A la inversa, cuando 22A10 está pre unido, 22A10 no puede unirse (última barra del grupo del medio) mientras que 7D9 y los otros anticuerpos pueden. Por lo tanto, no solo que 7D9 y 22A10 no compiten entre sí, sino que cada uno une un epítipo distinto de los otros siete anticuerpos. 7D9 compitió con sí mismo, pero no con otro anticuerpo (comparar cada barra a la señal máxima para cada anticuerpo que se une a la mesotelina en la placa en ausencia del anticuerpo 7D9 o 22A10 de cobertura de ELISA). En forma similar, 22A10 solo compitió con sí mismo y no con otros anticuerpos, con la inclusión de 7D9. Por lo tanto, 7D9 y 22A10 poseen distintos epítopos en relación a cada uno y a los otros anticuerpos monoclonales aislados.

Mapeo de Epítopos Mediante la Utilización de Quimeras de Mesotelina Humana:Ratón y Cyno:Humana y Análisis Mutacional

Se llevaron a cabo experimentos de mapeo de péptidos trípticos en los que h7D9.v3 estaba unido a mesotelina humana inmovilizada, que luego se incubó con tripsina, y los péptidos restantes protegidos por el anticuerpo se eluyeron y se identificaron mediante espectrometría de masas. Aquellos experimentos involucraron los aminoácidos 133–183 de SEQ ID N.º:43 como el sitio de unión de h7D9.v3. Para confirmar esta región, aprovechamos que 7D9 reaccionaba con mesotelina humana (constructo #387 que se muestra en la Figura 15), pero no de ratón (constructo #385) o cyno (constructo #383) para generar quimeras, que pronosticamos que deberían replicarse mejor que los mutantes de truncamiento. Construimos quimeras de mesotelina humano:ratón (#398 y #399) mediante un sitio MfeI silencioso (que codifique QL) en el aminoácido 131 y un sitio BglII silencioso (que codifique DL) en el aminoácido 213 para introducir secuencias humanas en el constructo de ratón. En forma adicional, se creó un cosntructo de cyno (#400) en el cual los aminoácidos 131–178 se reemplazaron por aquellos de la mesotelina humana mediante sitios MfeI. Cada constructo tenía una etiqueta gD del terminal N (no se muestra) para verificar la expresión.

Los constructos de mesotelina aferrados a GPI, etiquetados con gD que se muestran en la Figura 15 se expresaron en forma transitoria en las células 293 y se tiñeron con 0,02 µg/ml murino 7D9, 1 µg/ml murino 22A10, o 1 µg/ml etiqueta anti-gD (para normalizar los niveles de expresión diferenciales). Luego de la detección con el anticuerpo anti-ratón Alexa 488, se lavaron las muestras y se analizaron mediante FACS, y los datos de intensidad de fluorescencia se normalizaron a la señal anti-gD luego de la sustracción de cualquier entorno que teñía las células de control negativo 293 de tipo salvaje. Tal como se muestra en la Figura 16, 7D9 se une a la quimera humano:ratón #399 (tiene los aminoácidos humanos 1–213), pero no a la mesotelina de ratón de longitud completa #385 o #398 (tiene los aminoácidos humanos solamente de 1–131), lo cual indica que 7D9 se une a un epítipo entre aa 131 y 213. Su habilidad para unir la quimera cyno:humana #400 (tiene los aminoácidos 131–178), pero no el cyno de longitud completa (#383), limitó al epítipo a los aminoácidos entre 131 y 178. (Obsérvese que la unión de % relativamente menor observada con 7D9 que con 22A10 se debe al uso de una concentración de anticuerpo 50x menor para 7D9).

Las mismas quimeras se utilizaron para mapear el epítipo 22A10 reactivo a la rata, cyno y humano (pero no al ratón). Se observó unión en las células que expresaban la quimera #399, pero no la #398. Por lo tanto, 22A10 se une a un epítipo con un residuo crítico entre los aminoácidos 131–213. (Figura 16.)

Debido a que 7D9 y 22A10 no compiten entre sí (Figura 13), probablemente se unen a distintos epítipos dentro de los aminoácidos 131–213. Para identificar aquellos epítipos distintos, los tramos de aminoácidos 2–4 de la mesotelina humana se mutaron a los aminoácidos de ratón correspondientes en el entorno de la quimera #399. Una alineación de aminoácidos 132–212 entre las cuatro especies se muestra en la Figura 17, con recuadros numerados que indican la posición de los 15 mutantes. Para cada uno de los 15 mutantes en la tabla al final de la Figura 17, se muestran las secuencias humanas (arriba), que se mutaron a secuencias de ratón (abajo). (Nota: el mutante #11 no se generó en forma exitosa).

Todos los mutantes excepto el mutante #11 de la Figura 17 se expresaron en las células 293 y se sometieron al análisis FACS como en la Figura 16, excepto que se utilizaron 5 µg/ml versiones humanizadas de cada anticuerpo (es decir, etiqueta anti-gD h7D9.v3, h22A10.v83 y h5B6 (control positivo)), y se utilizó el anticuerpo anti-humano Alexa488 para la detección. Los resultados se muestran en la Figura 18A, con datos de fluorescencia que se muestran como un porcentaje

de la señal anti-gD para normalizar los niveles de expresión. (Nota: el mutante #13 no se expresó en las células 293 y por ello se omite del conjunto de datos). h7D9.v3 se unió a todos los mutantes excepto #6 y #9, mientras que h22A10.v83 se unió a todos los mutantes excepto al mutante #15 (flechas).

Mediante la alineación de las diferentes especies, los residuos claves en el epítipo h7D9.v3 se localizaron con precisión como dos únicos residuos de aminoácidos que difieren entre las secuencias humana y de cino de reactividad no cruzada: E153 en el mutante #6 y D174 en el mutante #9. La importancia de esos residuos para la unión de los anticuerpos se confirmó mediante la mutación de los residuos equivalentes en la mesotelina de cino a los residuos humanos correspondientes (es decir, R153 a E y G174 a D). h7D9.v3, que no se une de otro modo a la mesotelina de cino, fue capaz de unirse a los mutantes de la mesotelina de cino (Figura 18B). Estudios adicionales en los que el residuo E152 de la secuencia de mesotelina humana se mutó a Q resultaron en la inhibición de la unión de h7D9.v3, lo cual sugiere que el residuo E152 también participa en la unión de los anticuerpos.

En base a la estructura tipo armadillo de la mesotelina que se predijo recientemente (Sathyanarayana et al., *BMC Structural Biology* 9:1 (2009)), el anticuerpo 7D9 comunica en forma similar el espiral 4 interno y el espiral 5 externo de la mesotelina. En forma similar, debido a que h22A10.v83 reacciona en forma cruzada con la rata pero no con el ratón, el residuo E211 en el mutante #15 (en el espiral 6 externo de Sathyanarayana et al., *supra*) es asimismo un determinante crítico de su epítipo. La Figura 19 muestra los residuos unidos por h7D9.v3 y h22A10.v83.

La Glicosilación no inhibe la unión de h7D9.v3

A fin de determinar si h7D9.v3 se une a la mesotelina glicosilada, la mesotelina humana etiquetada con his de terminal C se expresó en células CHO, se purificó y además se separó de acuerdo a la carga en una columna Mono S en fracciones con glicosilación alta (fracción A11), media (A12), baja (B1) y de baja a ninguna (B5) de la mesotelina, tal como se muestra mediante la tinción de Azul de Coomassie en un gel SDS-PAGE. (Figura 20, izquierda superior). Cada fracción se pasó a través de un chip con 7D9.v3 pre unido, y se midieron las tasas de asociación y disociación para revelar afinidades idénticas (1,5 nM) para cada fracción (Figura 20, izquierda inferior), lo cual indica que la glicosilación no inhibe la unión de h7D9.v3. Estos datos se confirmaron al mostrar que h7D9.v3 podía

inmunoprecipitar todas las mismas bandas que el anticuerpo anti-gD h5B6 humanizado de las células HT1080 que expresaban en forma estable la mesotelina humana gD (la etiqueta del epítipo gD de la que carece sitios de glicosilación), lo cual indica que h7D9.v3 puede inmunoprecipitar mesotelina humana independientemente del estado de glicosilación. En contraste, el 22A10 humanizado inmunoprecipitó preferentemente las especies con menor peso molecular (menos glicosiladas), lo cual indica que la unión de 22A10 puede verse afectada por la glicosilación. (Figura 20, derecha).

Para evaluar la habilidad de un anticuerpo de prueba para unir mesotelina glicosilada en comparación con el h7D9.v3, se lleva a cabo un ensayo FACS en el cual la unión del anticuerpo de prueba a las células OVCAR3 se compara a la unión de h7D9.v3 a las células OVCAR3. Se utilizan anticuerpos secundarios apropiados para detectar la unión de h7D9.v3 y el anticuerpo de prueba a las células OVCAR3 (por ejemplo, se utiliza el anticuerpo anti-humano Alexa 647 para detectar la unión de h7D9.v3).

El Anticuerpo Monoclonal 19C3 Bloquea la Interacción de MUC16 con la Mesotelina

Se examinaron los anticuerpos monoclonales para determinar si eran capaces de bloquear la unión de MUC16 a la mesotelina. La unión de un fragmento biotinilado purificado de MUC16 (Muc16-Bt, con tres repeticiones de mucina) a la mesotelina expresada en forma estable en las células A431 (que normalmente no expresan mesotelina) se muestra en la Figura 21 ('no Ab'), panel izquierdo. La pre incubación de células con una proporción molar de 5 veces de 19C3, pero no 7D9, inhibió la unión de MUC16-Bt a la mesotelina, como se detectó mediante FACS con streptavidin-PE, tal como se muestra en la Figura 21, panel izquierdo. A la inversa, la unión de la mesotelina etiquetada con his8 de terminal C recombinante (purificada de las células 293) a las células PC3 que expresaban en forma estable MUC16 se evaluó en ausencia o presencia de un exceso molar de 5 veces de los anticuerpos anti-mesotelina indicados (Figura 21 panel derecho), que se detectaron mediante FACS con el anticuerpo Alexa647-anti-his6. La pre incubación de mesotelina con 19C3 pero no 7D9 o 22A10 inhibe la unión de la mesotelina a las células que expresan MUC16 (Figura 21, panel derecho). De hecho, 7D9 y 22A10 parecen mejorar la unión de la mesotelina a MUC16 en este ensayo.

Predominio de la Mesotelina Humana en Varios Tipos de Cáncer

La expresión de la mesotelina humana en varios cánceres se analizó mediante inmunohistoquímica. Se seccionaron micromatrices de tumor embebidas en parafina y fijadas con formalina (FFPE) (con un 1mm de núcleo por tumor) de adenocarcinoma ductal pancreático (Figura 22), adenocarcinoma seroso ovárico (Figura 23) y carcinoma pulmonar de células no pequeñas (Figura 24) en porciones microscópicas, se desparafinaron y rehidrataron a través de series de alcohol diluido. Las porciones se pre trataron para la recuperación de antígenos mediante la utilización de una Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Denmark), se neutralizaron, bloquearon y tiñeron con 10 µg/ml anticuerpo monoclonal de mesotelina anti-humano de ratón 19C3 durante 60 minutos en un autostainer de Dako. Luego del lavado, 19C3 se detectó con anticuerpo anti-ratón biotinilado, seguido del complejo ABC (VECTASTAIN ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se visualizó mediante la utilización de DAB (Pierce Laboratories) como cromogen. Las porciones luego se contratiñeron con Hematoxilina de Meyers y se deshidrataron con series de alcoholes y xilenos y luego se cubrió con un cubreobjetos mediante un medio de montaje orgánico (PermaMount, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

La tinción de la mesotelina (marrón) fue calificada por un patólogo experimentado de acuerdo al siguiente esquema, y se consideró la intensidad (oscuridad de la tinción marrón) así como también la amplitud de la tinción. Un ejemplo representativo de cada calificación de la mesotelina se muestra en las Figuras 22–24 para cada tipo de tumor.

0 (negativo): muy débil o sin tinción en el >90% de las células tumorales

1+ (leve): el patrón de tinción predominante es débil

2+ (moderado): el patrón de tinción predominante es moderadamente fuerte en la mayoría (> 50%) de las células neoplásticas

3+ (fuerte): el patrón de tinción predominante es fuerte en la mayoría (>50%) de las células neoplásticas

La Figura 22 muestra que el 70% de los adenocarcinomas ductales pancreáticos fueron positivos a la mesotelina, y muestra tinción en los niveles 1+, 2+, o 3+, con un 33% que muestra tinción en 2+ o 3+. La Figura 23 muestra que el 98% de los adenocarcinomas serosos ováricos fueron positivos a la mesotelina, y el 74% mostró tinción en el nivel 2+ o 3+. En forma adicional, las ocho metástasis que se examinaron de los adenocarcinomas serosos ováricos fueron positivas a la mesotelina, lo cual sugiere que los tumores ováricos primarios no

pierden expresión de mesotelina luego de la metástasis. La Figura 24 muestra que el 44% de los carcinomas pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, subtipo de adenocarcinoma) fueron positivos a la mesotelina, y el 26% mostró tinción en los niveles 2+ o 3+. En forma adicional, tres de las ocho (38%) metástasis acopladas examinadas de los tumores primarios positivos a la mesotelina de pacientes NSCLC mantuvieron la tinción positiva a la mesotelina.

La mesotelina también se expresó en mesoteliomas y en el cáncer de endometrio, tal como se determinó mediante IHC por medio del anticuerpo 19C3.

También se examinó la expresión de mesotelina en el mono cynomolgus. Las secciones de mesotelina pleurales del pulmón y pericárdicas del corazón de humanos (secciones embebidas en parafina y fijadas en formalina) y del mono cynomolgus (secciones congeladas) se seccionaron y tiñeron con el anticuerpo monoclonal 19C3 o 22A10, respectivamente. La mesotelina humana específicamente se tiñó con 19C3 (Figura 25, izquierda), y la mesotelina del mono cynomolgus específicamente se tiñó con 22A10 (Figura 25, derecha). Estos resultados demuestran que 22A10 puede reconocer la mesotelina de mono cynomolgus endógena, la cual posee una distribución similar a aquella de la humana.

Producción de Conjugados de Fármacos–Anticuerpo Anti–Mesotelina

Los conjugados de anticuerpo anti–mesotelina–fármaco (ADCs) se produjeron mediante la conjugación de h7D9.v3 y h22A10.v83 a la porción de enlace del fármaco MC–vc–PAB–MMAE, que se mostró con anterioridad en la Sección II.D. A los fines de la conveniencia, también se hace referencia a la porción de enlace del fármaco MC–vc–PAB–MMAE en estos Ejemplos y en las Figuras como “vcMMAE” o “VCE.” (Por ejemplo, se hace referencia a h7D9.v3–MC–vc–PAB–MMAE en estos Ejemplos y en las Figuras como h7D9.v3–vcMMAE o h7D9.v3–VCE.). En forma previa a la conjugación, los anticuerpos se redujeron parcialmente con TCEP mediante la utilización de métodos estándar de acuerdo con la metodología que se describe en WO 2004/010957 A2. Los anticuerpo parcialmente reducidos se conjugaron a la porción de enlace del fármaco mediante la utilización de métodos estándar de acuerdo con la metodología que se describe en Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778–784 y Estados Unidos 2005/0238649 A1. En resumen, los anticuerpos parcialmente reducidos se combinaron con la porción de enlace del anticuerpo para permitir la conjugación de la porción de los residuos de cisteína. Las reacciones de conjugación se

neutralizaron, y los ADCs se purificaron. Se determinó la carga del fármaco (cantidad promedio de porciones de fármaco por anticuerpo) para cada ADC y fue entre 3,33 y 4,0 en todos los casos.

Eficacia de h7D9.v3–vcMMAE en el Modelo HPAC In Vivo

La eficacia de h7D9.v3–vcMMAE se investigó mediante la utilización del modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático. Se inyectaron cinco millones de células HPAC (positivas a la mesotelina (2+) mediante IHC con 19C3) en HBSS en forma subcutánea en ratones beige SCID y los tumores recibieron dosis a 1,1, 2,7, 5,5, 11, y 16,4 mg/kg h7D9.v3–vcMMAE (a 3,5 MMAE/anticuerpo), o 5, 10 y 15 mg/kg h5B6 anti–gD–vcMMAE (con 3,3 MMAE por anticuerpo), o con 15 mg/kg h7D9.v3 desnudo (no MMAE). Como se muestra en la Figura 26, se obtuvo la inhibición sustancial del crecimiento tumoral a 5,5mg/kg de h7D9.v3–vcMMAE, y se obtuvieron regresiones a 11–16 mg/kg h7D9.v3–vcMMAE, pero no se observó un efecto significativo con el anticuerpo desnudo o con el control gD–vcMMAE a 15mg/kg. Se muestran los ajustes de curvas modelados en base a las tasas de crecimiento total. El panel inferior derecho de la Figura 26 muestra el análisis FACS y la internalización de h7D9.v3 en células HPAC y IHC.

Eficacia de h7D9.v3–vcMMAE en el Modelo de Adenocarcinoma Pancreático Primario

Se investigó la eficacia de h7D9.v3–vcMMAE en un modelo de adenocarcinoma pancreático primario (Oncotest, GMBH, Alemania). Se implantaron trozos de tumores pancreáticos humanos primarios positivos a la mesotelina (que expresaban mesotelina a 1–2+ mediante IHC) en forma subcutánea en ratones desnudos hembra NMRI, y recibieron dosis a 5, 10 y 20 mg/kg h7D9.v3–vcMMAE (3,5 MMAE/anticuerpo). Los volúmenes medio de tumores $\pm$ desviaciones estándar se grafican en la Figura 27. Se encontró una inhibición significativa del crecimiento tumoral en todas las dosis de h7D9.v3–vcMMAE. La IHC del tumor pancreático primario se muestra a la derecha.

Eficacia de h7D9.v3–vcMMAE en el Modelo de Cáncer Ovárico

Se investigó la eficacia de h7D9.v3–vcMMAE mediante la utilización de un modelo de xenoinjerto de cáncer ovárico. Se inyectaron diez millones de células OvCar3x2.1 (positivas a la Mesotelina (2–3+) mediante IHC con 19C3) en el

panículo adiposo mamario de ratones beige CB17 SCID, que luego recibieron dosis con 1, 2.5, 5, 10 y 15 mg/kg h7D9.v3–vcMMAE (3,5 MMAE/anticuerpo) o h5B6 anti–gD–vcMMAE (3,3 MMAE/anticuerpo). Como se muestra en la Figura 28, se observó una actividad modesta a 2,5mg/kg h7D9.v3–vcMMAE y regresiones a 5mg/kg y mayores, mientras que anti–gD–vcMMAE no exhibió actividad por debajo de 5 mg/kg (solo una actividad modesta a 10mg/kg y estasis tumoral a 15mg/kg). Se muestran los ajustes de curva modelados en base a las tasas de crecimiento. El panel derecho de la Figura 28 muestra el análisis FACS y la internalización de h7D9.v3 en células OvCar3x2.1 y IHC.

Eficacia de h7D9.v30–vcMMAE en un Modelo de Cáncer de Pulmón

Se investigó la eficacia de h7D9.v3–vcMMAE mediante la utilización de un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón (carcinoma de células escamosas). Se inyectaron cinco millones de células H226x2 (positivas a la mesotelina (3+) mediante IHC) en una mezcla 50:50 de Matrigel:HBSS en el costado de ratones CB17 SCID. Los volúmenes medio de tumores $\pm$ desviaciones estándar se grafican en la Figura 29. h7D9v3–vcMMAE (3.5 MMAE/anticuerpo) mostró una actividad modesta a 5mg/kg y estasis tumoral a 10mg/kg, mientras que no hubo actividad significativa con el conjugado de control anti–gD–vcMMAE (3,97 MMAE/anticuerpo) a ninguna de las dosis. El panel de la derecha de la Figura 29 muestra el análisis FACS y la internalización de h7D9.v3 en las células H226x2 y IHC.

h7D9.v3–vcMMAE y h22A10.v83–vcMMAE poseen una eficacia similar

Se investigó la eficacia de h7D9.v3–vcMMAE en comparación con la de h22A10.v83–vcMMAE. Se inocularon veinte millones de células BJAB que expresaban en forma estable la mesotelina gD–humana (izquierda) o la mesotelina gD–mono cynomolgus (derecha) en forma subcutánea en ratones CB17 SCID en buffer HBSS. Los ratones recibieron dosis con 0,5 o 2 mg/kg h7D9.v3–vcMMAE (en ratones inoculados con mesotelina BJAB–gD–humana) o h22A10.v83–vcMMAE (en ratones inoculados con mesotelina BJAB–gD–mono cynomolgus), o con anti–gD–vcMMAE a 2mg/kg utilizado como control positivo y como un normalizador para cualquier diferencia en la expresión entre las dos especies de la línea celular. Los volúmenes medio de tumores $\pm$ desviaciones estándar se grafican en la Figura 30. Tanto h7D9.v3–vcMMAE como h22A10.v83–vcMMAE exhibieron una mejor actividad a 2mg/kg que el control gD–vcMMAE

contra los tumores de mesotelina BJAB–gD–humana y la mesotelina BJAB–gD–mono cynomolgus, respectivamente. El control negativo en este experimento fue un anticuerpo irrelevante conjugado a vcMMAE, el cual no mostró una actividad significativa.

Para evaluar en forma adicional la actividad de h22A10.v83–vcMMAE, los tumores H226x2 de la Figura 29 y OvCar3x2.1 cultivados como se describe en la Figura 28 recibieron dosis con las concentraciones indicadas de h7D9.v3–vcMMAE y h22A10.v83–vcMMAE (3.53 MMAE/anticuerpo), o anti–gD–vcMMAE como un control negativo. Los volúmenes medio de tumores $\pm$ desviaciones estándar se grafican en la Figura 31. A pesar de la unión significativamente más débil del h22A10.v83desnudo en comparación con h7D9.v3 a estas dos líneas celulares mediante FACS, h22A10.v83–vcMMAE fue efectivo en forma similar a h7D9.v3–vcMMAE en el modelo H226x2 (panel superior izquierdo), y solamente un poco menos activo en el modelo OvCar3x2.1 (panel superior derecho), tal como se indicó por la regresión más rápida de los tumores luego de la dosis de 6mg/kg.

MUC16 y la Mesotelina Forman un Complejo en las Líneas Celulares “Duales Positivas”

Se investigó la interacción de MUC16 y la mesotelina en las líneas celulares. Las células OvCar3, que expresan tanto la mesotelina como MUC16, se lisaron en 1% de NP40 buffer. Como se muestra en la Figura 32, panel izquierdo, los lisatos se inmunoprecipitaron con m7D9 o IgG de control de isótopos y se sometieron al análisis de western blot con un anticuerpo anti–MUC16 (upper blot) o h7D9 (lower blot) para detectar complejos mesotelina:MUC16 o la mesotelina total, respectivamente. (20% de la entrada no inmunoprecipitada se muestra en la senda izquierda). m7D9 fue capaz de co–inmunoprecipitar a MUC16 con la mesotelina de los lisatos de las células OvCar3. Ese resultado demuestra que MUC16 forma un complejo con la mesotelina en las líneas celulares que expresan tanto la mesotelina como MUC16 (es decir, líneas celulares “duales–positivas”).

Tal como se muestra en la Figura 32, panel derecho, los anticuerpos para la mesotelina o MUC16 se utilizaron para inmunoprecipitar (IP) aquellas proteínas de medios condicionados en los cuales se cultivaron las líneas celulares indicadas. Las líneas celulares expresan solamente mesotelina (HPAC), solamente MUC16 (A431), ni (H520), o ambos (células OvCar3, CAPAN–2, EKVX y OvCar429). Se

utilizó el anticuerpo quimérico anti-mesotelina ch7D9 (paneles superior e inferior) o el anticuerpo anti-MUC16 (panel medio) para las inmunoprecipitaciones. Los inmunoprecipitados lavados se sometieron al análisis de Western blot (WB) con anticuerpo anti-mesotelina de murino 2E5 (superior) o el anticuerpo (tipo M11) anti-dominio-MUC16 B de murino 1.B.823 (US Biological, Swampscott, MA; paneles medio e inferior). En consecuencia, el panel superior muestra la mesotelina inmunoprecipitada de las líneas celulares que expresan mesotelina, el panel medio muestra MUC16 inmunoprecipitado de las líneas celulares que expresan MUC16, y el panel inferior muestra los complejos inmunoprecipitados de mesotelina:MUC16, que son específicos de las líneas celulares que expresan ambas proteínas (líneas celulares duales-positivas). Estos resultados indican que la mesotelina puede verse en el medio cuando esté unida a MUC16. En consecuencia, los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles para tratar el cáncer positivo a la mesotelina, con la inclusión de cánceres duales-positivos.

19C3, y No 7D9, Desplaza el MUC16 Pre Unido de la Mesotelina

Se investigó la unión de 19C3 a la mesotelina en presencia de MUC16. MUC16-biotin (1ug/ml, o 9,2nM) estaba pre unido a las células HT1080 que expresaban mesotelina. 19C3 (5ug/ml) se añadió para determinar si podía desplazar al MUC16 pre unido. MUC16-biotin se detectó con el reactivo de detección SAPE, y el anticuerpo unido se detectó con anticuerpo anti-ratón Alexa488. La Figura 33 muestra que 19C3 efectivamente era capaz de desplazar MUC16 y unirse a la mesotelina. El anticuerpo 7D9 (33nM), que se une a una región de la mesotelina fuera del sitio de unión de MUC16, se utilizó como un control negativo y como se esperaba, no fue capaz de desplazar al MUC16 pre unido. Experimentos adicionales demostraron que 19C3 también desplaza a MUC16 a 0,1ug/ml, mientras que el anticuerpo 2E5 puede desplazar a MUC16 solamente a ≥ 5 ug/ml (no se muestran los datos).

Si bien la invención que antecede se ha descrito en detalle por medio de la ilustración y los ejemplos a los fines de la claridad en la comprensión, no debe interpretarse que las descripciones y los ejemplos limitan el alcance de la invención. Las descripciones de todas las patentes y la bibliografía científica que se citan en la presente se incluyen en forma expresa en su totalidad a modo de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a mesotelina seleccionada de:
 - (i) un anticuerpo que se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E153 y D174 y que opcionalmente posee una o más de las siguientes características:
 - (a) no presenta unión reducida a forma glicosilada de mesotelina;
 - (b) no bloquea la unión de mesotelina a MUC16; y
 - (c) se une mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM;
 - (ii) un anticuerpo que se une a un epítipo de SEQ ID N.º:43 que comprende E211 y que opcionalmente posee una o más de las siguientes características:
 - (a) no bloquea la unión de mesotelina a MUC16; y
 - (b) se une mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM;
 - y
 - (iii) un anticuerpo que se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 1–131 de SEQ ID N.º:43 y se une a mesotelina con una afinidad de ≤ 5 nM.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un fragmento de anticuerpo que se une a mesotelina.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la mesotelina es una mesotelina humana de SEQ ID N.º:43.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende:
 - (a) (i) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22, (ii) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19, y (iii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21;

(b) (i) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:39, (ii) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35, y (iii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37; o

(c) HVR–H3, HVR–L3, y HVR–H2 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA–11464.

7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende

(a) (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21, y (iii) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22;

(b) (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37, y (iii) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:39; o

(c) HVR–H1, HVR–H2, y HVR–H3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA–11464.

8. El anticuerpo de la reivindicación 7, que comprende:

(a) (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21, (iii) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22, (iv) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (v) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (vi) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19;

(b) (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37, (iii) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:39, (iv) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (v) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (vi) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35; o

(c) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464.

9. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende

(a) (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19;

(a) (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35; o

(c) HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464.

10. El anticuerpo de la reivindicación 8(a) o 9(a), que además comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una secuencia FR2 marco de SEQ ID N.º:25 y una secuencia FR3 de SEQ ID N.º:27.

11. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende

(a) una secuencia VH que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:8;

(b) una secuencia VL que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4;

(c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b);

(d) una secuencia VH que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:16;

(e) una secuencia VL que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:12;

(f) una secuencia VH como en (d) y una secuencia VL como en (e);

(g) una secuencia VH que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la secuencia VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464;

(h) una secuencia VL que posee al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464; o

(i) una secuencia VH como en (g) y una secuencia VL como en (h);

12. El anticuerpo de la reivindicación 11, que comprende una secuencia VH de SEQ ID N.º:8, una secuencia VH de SEQ ID N.º:16, o una secuencia VH del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464.

13. El anticuerpo de la reivindicación 11, que comprende una secuencia VL de SEQ ID N.º:4, una secuencia VL de SEQ ID N.º:12, o una secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464.

14. Un anticuerpo que comprende (a) una secuencia VH de SEQ ID N.º:8 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:4; (b) una secuencia VH de SEQ ID N.º:16 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:12; (c) una secuencia VH y una secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464; o (d) el anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464.

15. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo IgG1, IgG2a o IgG2b.

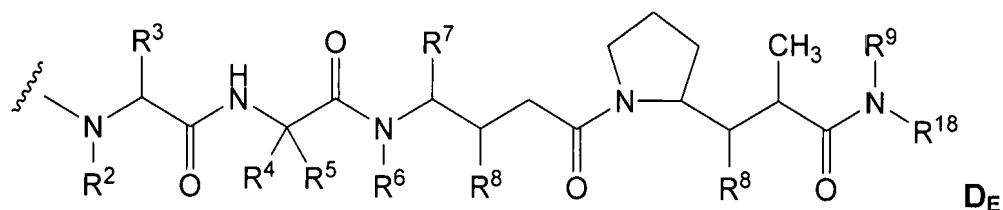
16. El ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

17. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 16.

18. Un método de producción de un anticuerpo que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 17 de manera que se produzca el anticuerpo.

19. Un inmunoconjugado que posee la fórmula $Ab-(L-D)_p$, en donde:

- (a) Ab es un anticuerpo como en cualquiera de las reivindicaciones 1–15;
 (b) L es una unión;
 (c) D es un fármaco de la fórmula D_E



y en donde R² y R⁶ son cada uno metilo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es H, R⁷ es sec-butilo, cada R⁸ es independientemente seleccionado de CH₃, O-CH₃, OH, y H; R⁹ es H; y R¹⁸ es -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo; y
 (d) p varía desde 1–8.

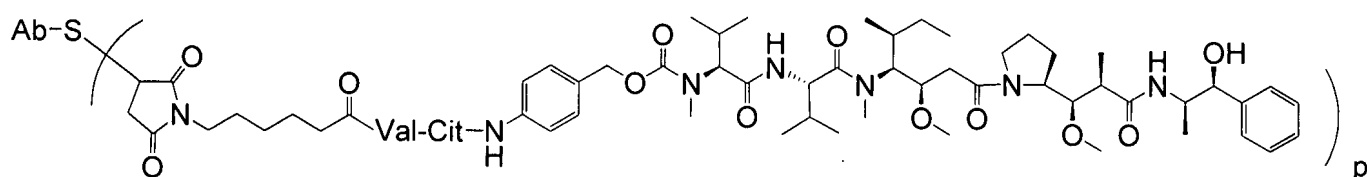
20. El immunoconjugado de la reivindicación 19, en donde el fármaco es una auristatina.

21. El immunoconjugado de la reivindicación 20, en donde el fármaco es MMAE.

22. El immunoconjugado de la reivindicación 19, en donde la unión es escindible por una proteasa.

23. El immunoconjugado de la reivindicación 22, en donde la unión comprende un dipéptido val-cit.

24. El immunoconjugado de la reivindicación 19 que posee la fórmula:



en donde S es un átomo de azufre.

25. El immunoconjugado de la reivindicación 24, en donde p varía desde 2–5.

26. El inmunoconjugado de la reivindicación 24, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 8(a).

27. El inmunoconjugado de la reivindicación 24, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 8(b).

28. El inmunoconjugado de la reivindicación 24, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 14(a).

29. El inmunoconjugado de la reivindicación 24, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 14(b).

30. Una formulación farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 19–29 y un portador farmacéuticamente aceptable.

31. La formulación farmacéutica de la reivindicación 30, que además comprende un agente terapéutico adicional.

32. La formulación farmacéutica de la reivindicación 31, en donde el agente terapéutico adicional es gemcitabina.

33. La formulación farmacéutica de la reivindicación 31, en donde el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-MUC16 conjugado a un agente citotóxico.

34. El inmunoconjugado como en cualquiera de las reivindicaciones 19–29 para el uso como un medicamento.

35. El inmunoconjugado como en cualquiera de las reivindicaciones 19–29 para el uso en el tratamiento de un cáncer positivo para mesotelina.

36. El inmunoconjugado para el uso como en la reivindicación 35, en donde el cáncer positivo para mesotelina se selecciona de cáncer pancreático, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer endometrial, y mesotelioma.

37. El immunoconjugado para el uso como en la reivindicación 35, en donde el cáncer positivo para mesotelina es un cáncer dual-positivo.

38. Uso del immunoconjugado como en cualquiera de las reivindicaciones 19-29 en la producción de un medicamento.

39. El uso de la reivindicación 38, en donde el medicamento es para el tratamiento de un cáncer positivo para mesotelina.

40. El uso de la reivindicación 39, en donde el cáncer positivo para mesotelina se selecciona de cáncer pancreático, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer endometrial, y mesotelioma.

41. El uso de la reivindicación 39, en donde el cáncer positivo para mesotelina es un cáncer dual-positivo.

42. Un método de tratamiento de un individuo que posee un cáncer positivo para mesotelina, el método que comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un immunoconjugado como en cualquiera de las reivindicaciones 19-29.

43. El método de la reivindicación 42, en donde el cáncer positivo para mesotelina se selecciona de cáncer pancreático, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer endometrial, y mesotelioma.

44. El método de la reivindicación 42, en donde el cáncer positivo para mesotelina es un cáncer dual-positivo.

45. El método de la reivindicación 42, que además comprende la administración de un agente terapéutico adicional al individuo.

46. El método de la reivindicación 45, en donde el agente terapéutico adicional es gemcitabina.

47. El método de la reivindicación 45, en donde el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-MUC16 conjugado a un agente citotóxico.

48. Un método de inhibir la proliferación de una célula positiva para mesotelina, el método que comprende exponer la célula a un inmunoconjugado como en cualquiera de las reivindicaciones 19–29 en condiciones que permitan la unión del inmunoconjugado a mesotelina en la superficie de la célula, de este modo, se inhibe la proliferación de la célula.

49. El método de la reivindicación 48, en donde la célula es una célula de cáncer pancreático, de ovarios, de pulmón o endometrial o célula de mesotelioma.

50. El método de la reivindicación 48, en donde la célula es una célula dual–positiva.

51. Un anticuerpo como en cualquiera de las reivindicaciones 1–15 conjugado a un marcador.

52. El anticuerpo de la reivindicación 51, en donde el marcador es un emisor de positrones.

53. El anticuerpo de la reivindicación 52, en donde el emisor de positrones es ^{89}Zr .

54. Un método para detectar mesotelina humana en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti–mesotelina como en cualquiera de las reivindicaciones 1–15 en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti–mesotelina a una mesotelina humana que ocurre naturalmente, y detectar si un complejo se forma entre el anticuerpo anti–mesotelina y una mesotelina humana que ocurre naturalmente en la muestra biológica.

55. El método de la reivindicación 54, en donde el anticuerpo anti–mesotelina es un anticuerpo como en cualquiera de las reivindicaciones 8(c), 14(c), y 14(d).

56. El método de la reivindicación 54, en donde la muestra biológica es una muestra de cáncer pancreático, muestra de cáncer de ovarios, muestra de un cáncer de pulmón, muestra de cáncer endometrial o muestra de mesotelioma.

57. El método de la reivindicación 54, en donde el método comprende llevar a cabo la inmunohistoquímica en una sección de tejido.

58. El método de la reivindicación 54, en donde la muestra biológica es suero.

59. Un método de detección de cáncer positivo para mesotelina que comprende (i) administrar un anticuerpo anti-mesotelina marcado a un sujeto que padece o se sospecha que padece un cáncer positivo para mesotelina, en donde el anticuerpo anti-mesotelina marcado comprende un anticuerpo anti-mesotelina en cualquiera de las reivindicaciones 1-15, y (ii) detectar el anticuerpo anti-mesotelina marcado en el sujeto, en donde la detección del anticuerpo anti-mesotelina marcado indica un cáncer positivo para mesotelina en el sujeto.

60. El método de la reivindicación 59, en donde el anticuerpo anti-mesotelina marcado es un anticuerpo como en la reivindicación 8(a) o 14(a) que está marcado.

61. El método de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, en donde el anticuerpo anti-mesotelina marcado comprende un anticuerpo anti-mesotelina conjugado a un emisor de positrones.

62. El método de la reivindicación 61, en donde el emisor de positrones es ^{89}Zr .

63. El anticuerpo de la reivindicación 8 que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:20, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:21, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:22, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:17, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:18, y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:19.

64. El anticuerpo de la reivindicación 63, que además comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una secuencia FR2 marco de SEQ ID N.º:25 y una secuencia FR3 de SEQ ID N.º:27.

65. El anticuerpo de la reivindicación 8 que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:36, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:37, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:39, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:33, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:34, y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:35.

66. El anticuerpo de la reivindicación 8 que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464.

67. El anticuerpo de la reivindicación 14 que comprende una secuencia VH de SEQ ID N.º: 8 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:4.

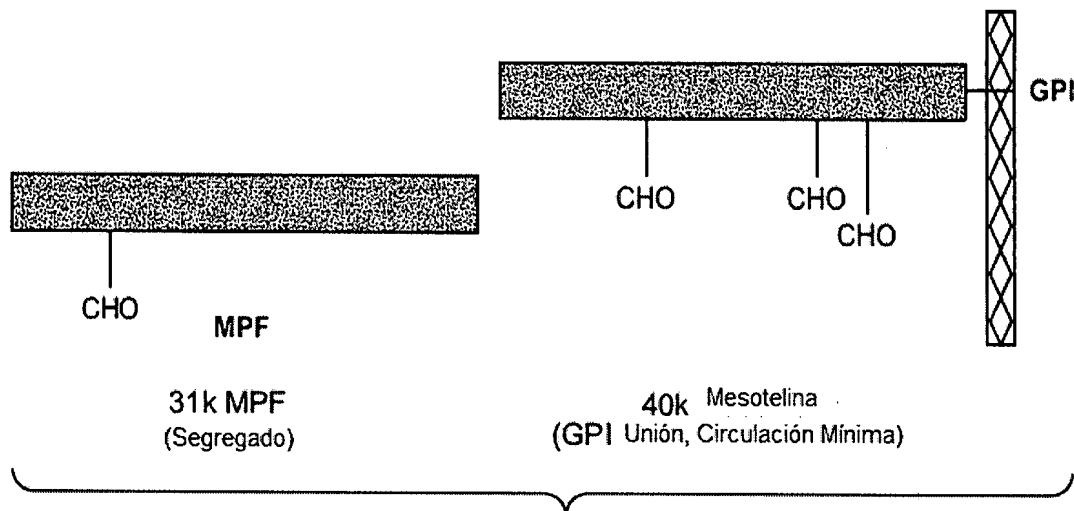
68. El anticuerpo de la reivindicación 14 que comprende una secuencia VH de SEQ ID N.º: 16 y una secuencia VL de SEQ ID N.º:12.

69. El anticuerpo de la reivindicación 14 que comprende una secuencia VH y una secuencia VL del anticuerpo producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso a ATCC N.º PTA-11464.

70. El anticuerpo de la reivindicación 14 producido por el hibridoma 19C3 que posee el Acceso de ATCC N.º PTA-11464.

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos anti-mesotelina e inmunoconjugados y métodos de uso de los mismos.



204885_s_at gen.NM_005823 Homo sapiens mesotelina, variante de transcripción 1

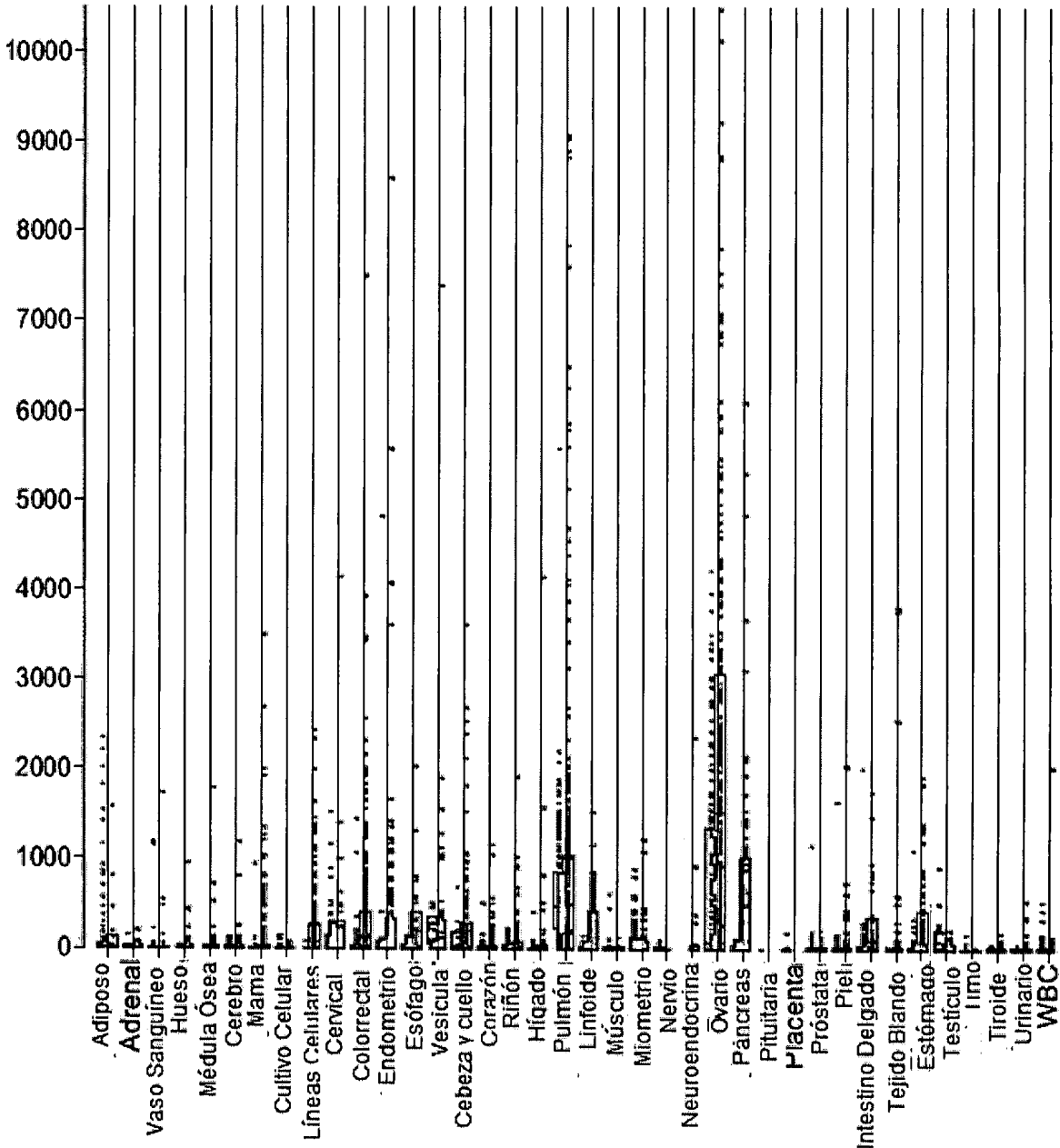


FIG. 2

Anticuerpos Monoclonales Anti-Mesotelina

mAb	Isotipo	Grupo de Epítopo	Región de Epítopo	¿Bloquea la unión de muc16?	I (nM) Biacore
7D9	G1	A	152-175	Aumenta	0,23
19C3	G2b	C	1-70	SI	0,06
2E5	G2	C	1-70	SI	0,49
8B11	G1	B1	71-131	No	138
17A5	G1	B1	71-131	No	n.d.
11H8	G2b	B1	71-131	No	n.d.
16D5	G2a	B2	71-131	Aumenta	2,21
18D12	G2b	B3	131-178	No	n.d.
3H2	G1	B	71-131	Aumenta	n.d.
22A10	G2a	D	209-212	Aumenta	4,25
15F7	G2a	E	1-131	No	n.d.
12F6	G2a	E	n.d.	n.d.	780

FIG. 3

Alineación de Regiones de Cadena Variable (7D9 Murino y Humanizado)																																																
Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37					
																								Kabat - CDR L1																								
																								Chothia - CDR L1																								
																								Contacto - CDR L1																								
huKI	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q											S	I	S	N	T	L	A	N	Y	Q	
mu7D9	D	I	N	T	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	A	G	E	K	V	T	N	S	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A	N	Y	Q						
7D9.v1	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A	N	Y	Q					
7D9.v3	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A	N	Y	Q					
	.	.																																														
Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80				
																										Kabat - CDR L2																						
																										Chothia - CDR L2																						
																										Contacto - CDR L2																						
huKI	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P					
mu7D9	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	N	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	Q	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	V	Q	A					
7D9.v1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	N	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P					
7D9.v3	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	N	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P					
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.														.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	SEQ ID N.º:													
																										Kabat - CDR L3																						
																										Chothia - CDR L3																						
																										Contacto - CDR L3																						
huKI	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	Q	T	R	S	L	P	N	R	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R			1																	
mu7D9	E	D	L	A	T	T	T	C	E	Q	T	L	S	S		T	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R			2																		
7D9.v1	E	D	F	A	T	T	T	C	E	Q	T	L	S	S		T	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R			3																	
7D9.v3	E	D	F	A	T	T	T	C	E	Q	T	L	S	S		T	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R			4																	
	.	.							.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

FIG. 4

h4

Variantes Humanizadas Y Quiméricas de 7D9

	LC	HC	KD (nM) Sobre MSNL Humana
7D9 Quimérico	Quimérico	Quimérico	1,84
7D9.v1	V _{KI} Injerto	VH _{ATA} Injerto	3,98
7D9.v2	Y36F, Y87F	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S y L80M	1,78
7D9.v3	Y36F, Y87F	VH _{ATA} Injerto	1,9
7D9.v4	V _{KI} Injerto	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S and L80M	3,01
7D9.v5	Y36F	VH _{ATA} Injerto	3,49
7D9.v6	Y87F	VH _{ATA} Injerto	4,08

FIG. 6

Alineación de Regiones de Cadena Liviana Variable (22A10 Murino y Humanizado)																																															
Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37				
																							Kabat - CDR L1																								
																							Chothia - CDR L1																								
																							Contacto - CDR L1																								
huKI	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	N	Y	Q				
22A10												G	A	S	L	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								D	I	S	N	Y	L	N	N	Y	Q			
hu22A10 injerto	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								D	I	S	N	Y	L	N	N	Y	Q			
22A10.v83	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								D	I	S	N	Y	L	N	N	Y	Q			
Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80			
																							Kabat - CDR L2																								
																							Chothia - CDR L2																								
																							Contacto - CDR L2																								
huKI	Q	X	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	P	T	L	T	I	S	S	L	Q	P				
22A10	Q	X	P	D	G	T	V	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	R	S	G	V	P	S	R	F	S	A	S	G	S	G	T	D	T	S	L	T	I	S	R	L	E	Q				
hu22A10 injerto	Q	X	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	R	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	P	T	L	T	I	S	S	L	Q	P				
22A10.v83	Q	X	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	R	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	P	T	L	T	I	S	S	L	Q	P				
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	Kabat - CDR L3				Chothia - CDR L3				Contacto - CDR L3				SEQ ID N.º
huKI	E	D	F	A	T	Y	T	C	Q	Q	T	R	S	L	P								W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	9											
22A10	S	D	E	A	T	Y	T	C	Q	Q	G	N	T	L	P								Y	T	F	G	G	G	T	K	L	S	I	K	R	10											
hu22A10 injerto	S	D	F	A	T	Y	T	C	Q	Q	G	N	T	L	P								Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	11											
22A10.v83	S	D	F	A	T	Y	T	C	Q	Q	G	N	T	L	P								Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	12											

FIG. 7

411

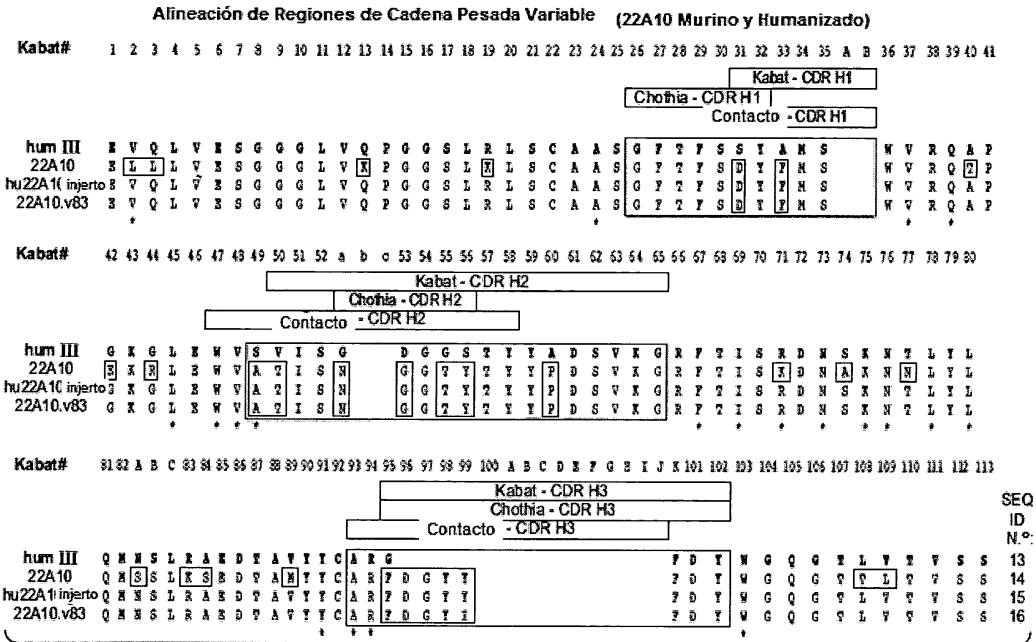


FIG. 8

: Análisis Scatchard de Variantes 22A10 Humanizada sobre Células Estables BJAB gD-Mesotelina

Moviéndose Sobre	-		Cyno		Cyno+Hu		Cyno	
h22A10 Versión	Injerto nM	Sitios de Injerto	v1 nM	v1 Sitios	v17 nM	v17 Sitios	v83 nM	v83 Sitios
BJAB Cynol	1,0	25000	1,0	21000	1,0	25000	1,3	45000
BJAB Humano	1,6	18000	1,9	16000	1,7	17000	1,8	31000
BJAB Rata	1,9	22400	2,8	15000	3,9	24000	2,7	31000

FIG. 9A

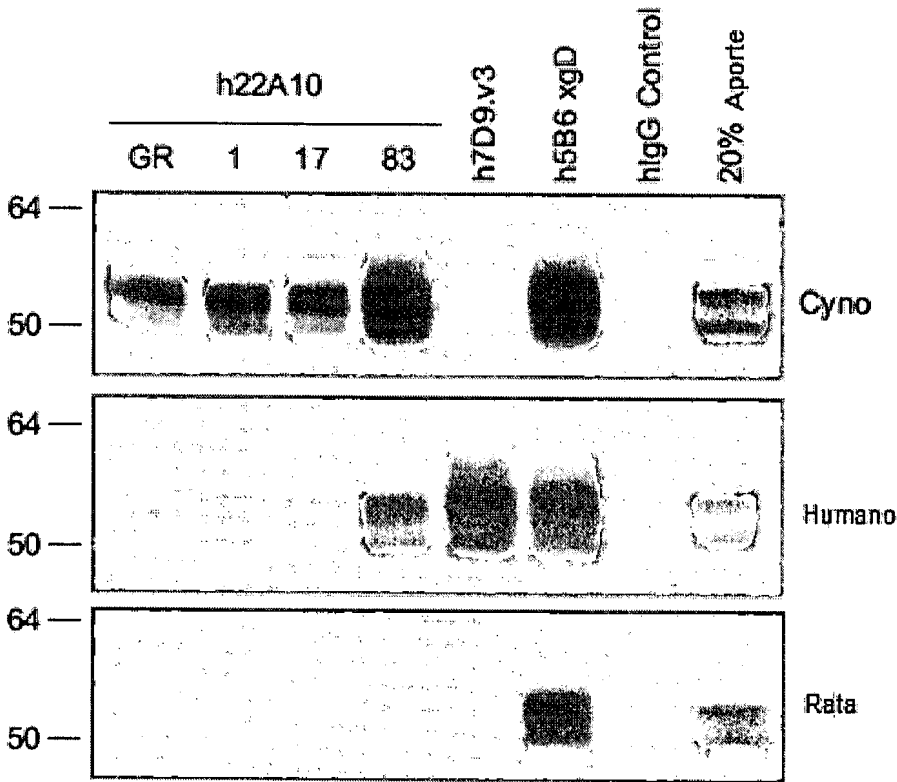


FIG. 9B

Región de 7D9 Anticuerpo Humanizado	Secuencia	SEQ ID N.º:
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L1	KSSQSVLYSSNQKNYLA	17
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L2	WASTRES	18
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L3	HQYLSSYT	19
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H1	GYTFTTYWMH	20
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H2	GYIRPSTGYTEYNQKFKD	21
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H3	ARSRWLLDY	22
h7D9.v1, h7D9.v3 VL-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	23
h7D9.v1 VL-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	24
h7D9.v3 VL-FR2	WFQQKPGKAPKLLIY	25
h7D9.v1 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	26
h7D9.v3 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC	27
h7D9.v1, h7D9.v3 VL-FR4	FGQGTKVEIKR	28
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	29
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR2	WVRQAPGKGLEWV	30
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	31
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR4	WGQGT LVTVS	32

FIG. 10A

Región de 22A10 Anticuerpo Humanizado	Secuencia	SEQ ID N.º:
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 HVR-L1	RASQDISNYLN	33
h22A10 _{injer.} h22A10v.83 HVR-L2	YTSRLHS	34
h22A10 _{injer.} h22A10v.83 HVR-L3	QQGNTLPYT	35
h22A10 _{injer.} h22A10v.83 HVR-H1	GFTFSDYFMS	36
h22A10 _{injer.} h22A10v.83 HVR-H2	ATISNGGTYTYYPDSVKG	37
h22A10 _{injer.} -HVR-H3	ARFDGYIFYDY	38
h22A10v.83 HVR-H3	ARFDGYIFYDY	39
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 VL-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	23
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 VL-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	24
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	26
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 VL-FR4	FGQGTKVEIKR	28
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 VH-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	29
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 VH-FR2	WVRQAPGKGLEWV	30
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 VH-FR3	RFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYC	40
h22A10 _{injer.} h22A10.v83 VH-FR4	WGQGT LVTVSS	41

FIG. 10B

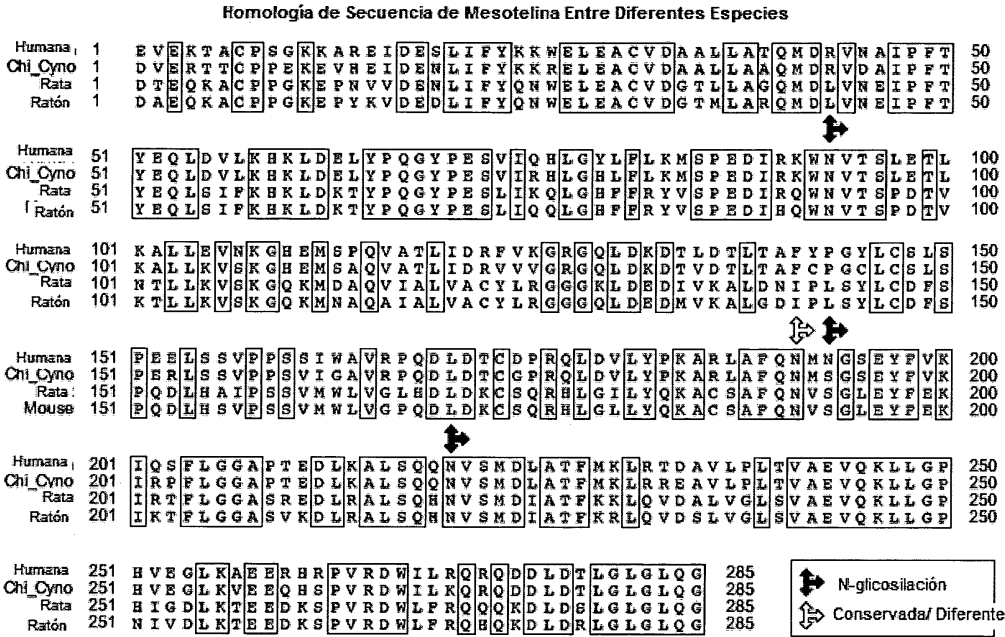


FIG. 11

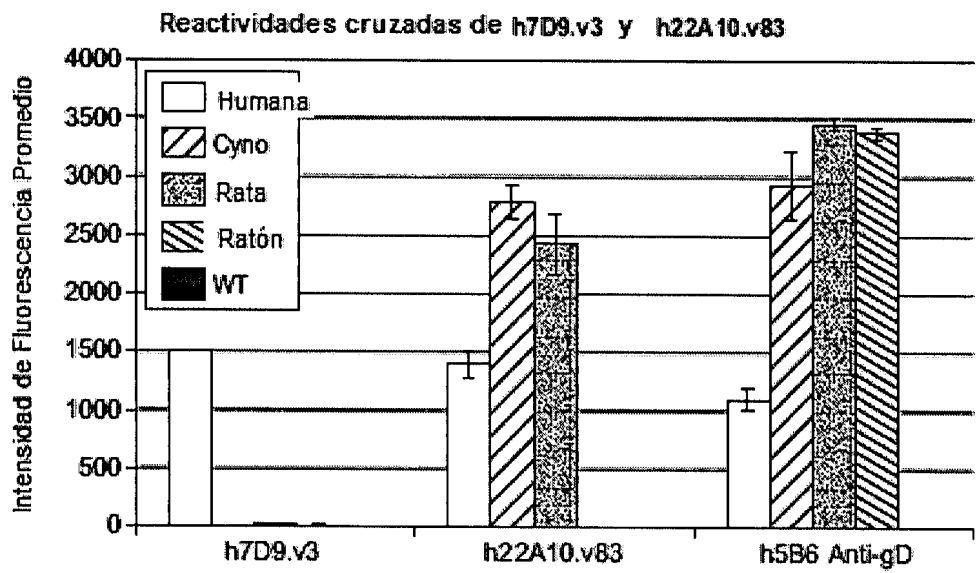


FIG. 12

Afinidades de Anticuerpo Anti-Mesotelina

Análisis Scatchard en las Líneas Celulares Endógenas y Transfetadas Establemente de Mesotelina:

		h7D9.v3	Copia #	h22A10.v83	Copia #
		Kd (nM)		Kd (nM)	
Humana	BJAB	0,25	20000	1,8	45000
	Cyno BJAB	n.d.		1,3	31000
	Rata BJAB	n.d.		2,7	31000
Humana	293	0,2	n.d.	2,7	80500
	Cyno 293	n.b.		4,3	356000
	Rata 293	n.d.		7,3	81000
Humana	HT1080	0,97	130000	6,2	38000
	Cyno HT1080	n.d.		6,4	113000
	Rata 4A-RM4	n.d.		6,2	171000
Endógena	OvCar3	0,53	14178	9,2	5516
	OvCar3x2.1	0,56	39963	9	15294
	HPAC	1	2600	9,4	7300
	Capan2	0,63	10000	4,2	11250
	AsPC1	0,58	2300	9,3	7100
	HPAF-II	0,41	4200	10,45	6400

FIG. 13

FIG. 14

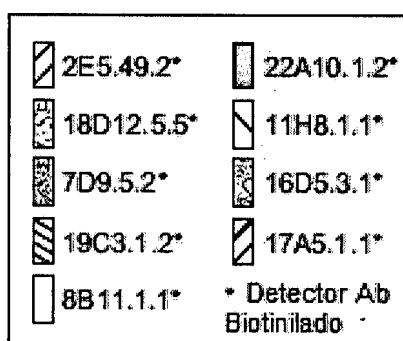
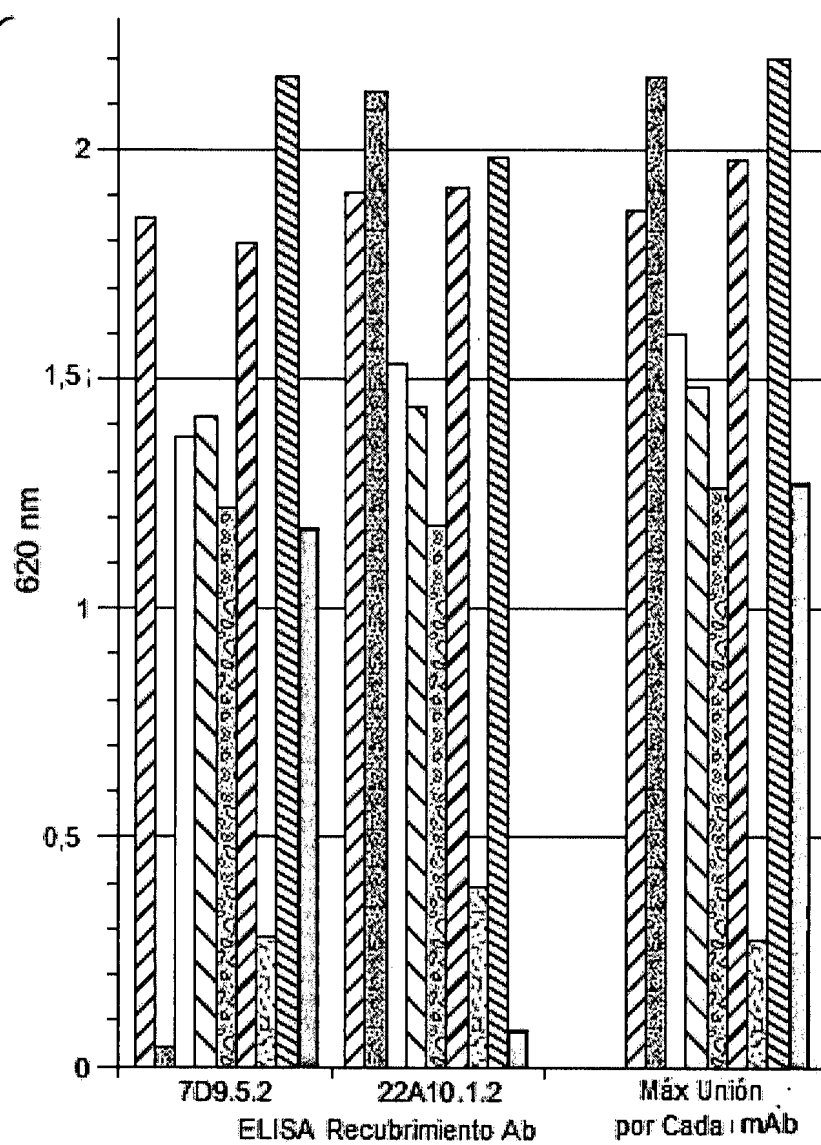
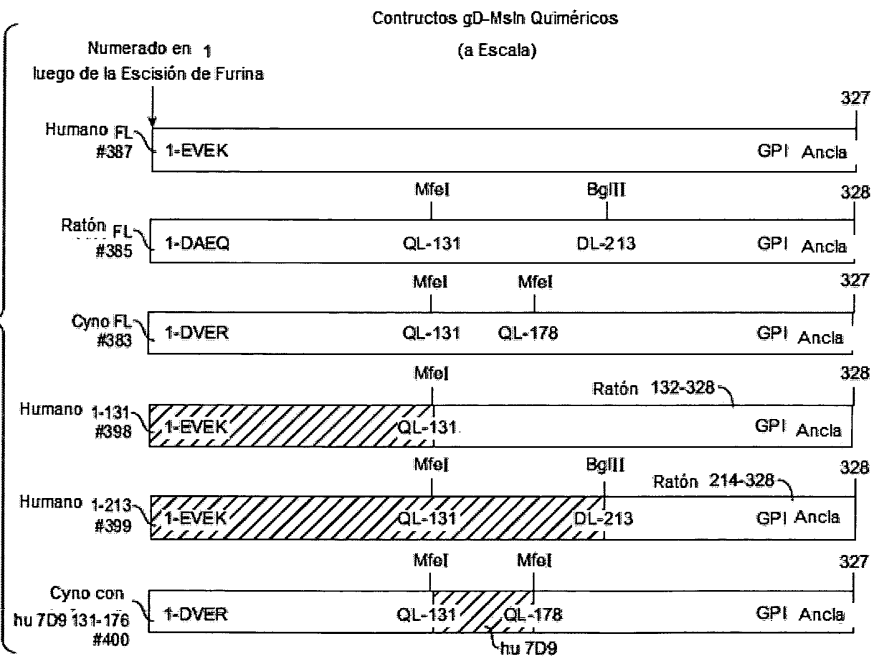
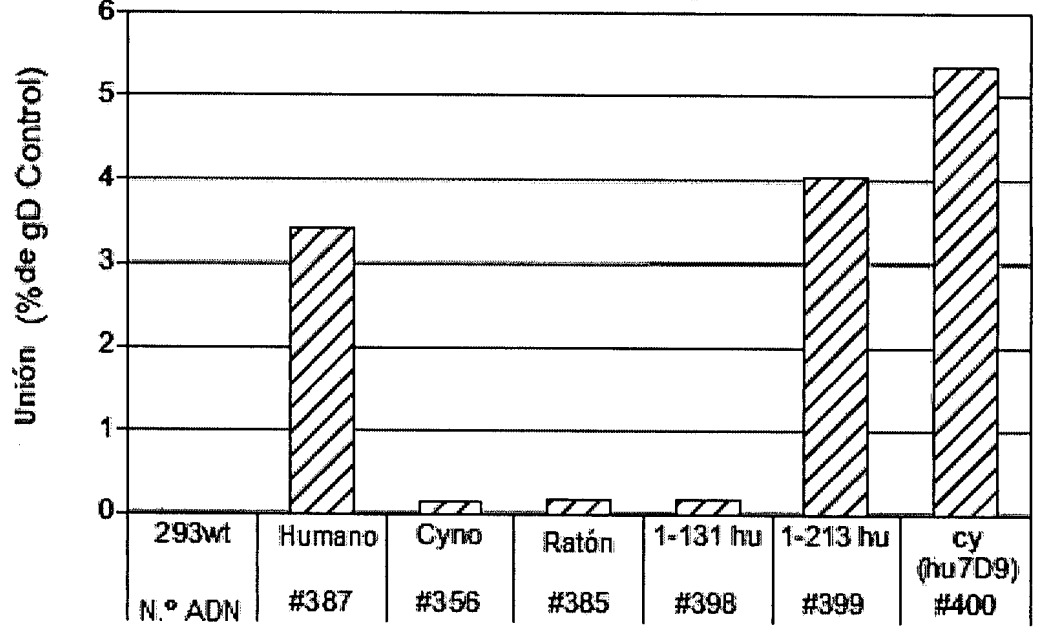


FIG. 15



7D9 y 22A10 FACS en Células que Expresan Mesotelina Quimérica
0,02 µg/ml Unión m7D9



1µg/ml Unión m22A10

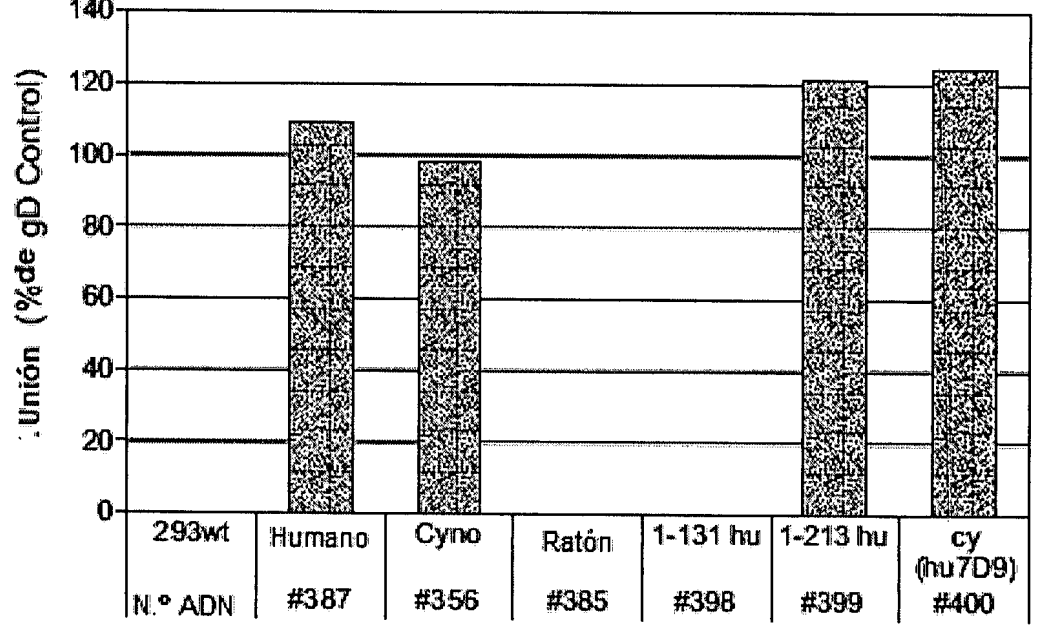


FIG. 16

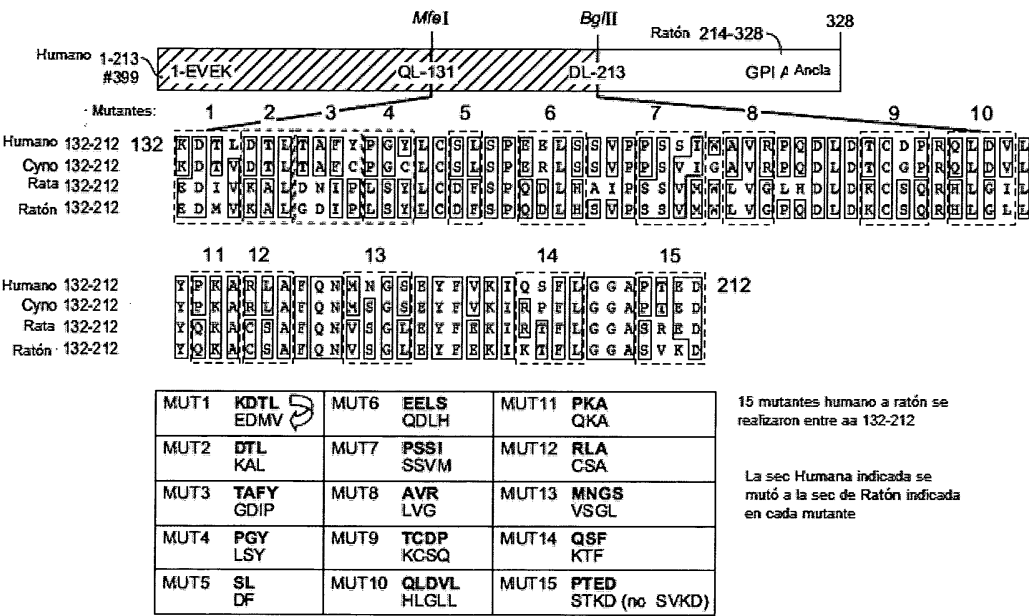


FIG. 17

126

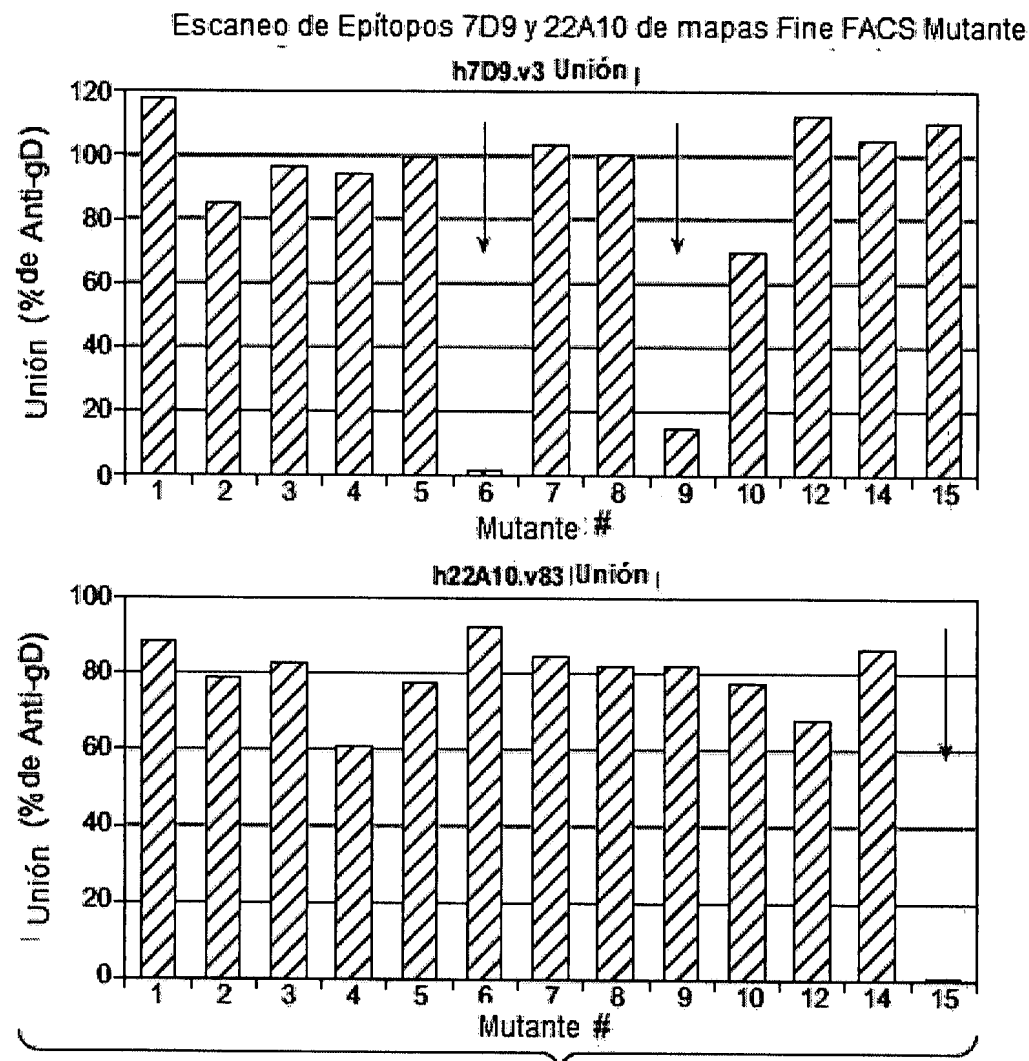


FIG. 18A

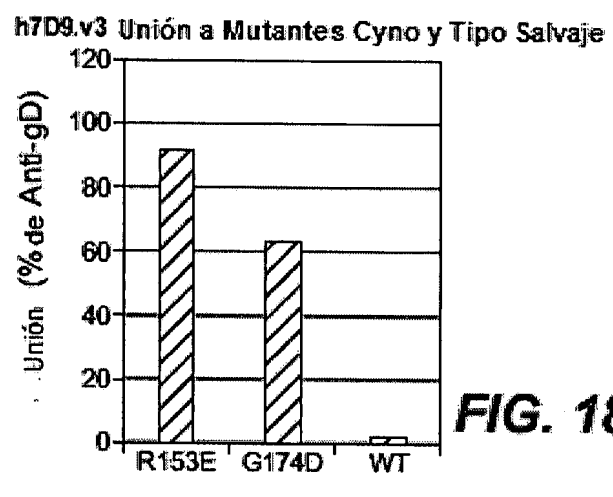


FIG. 18B

128



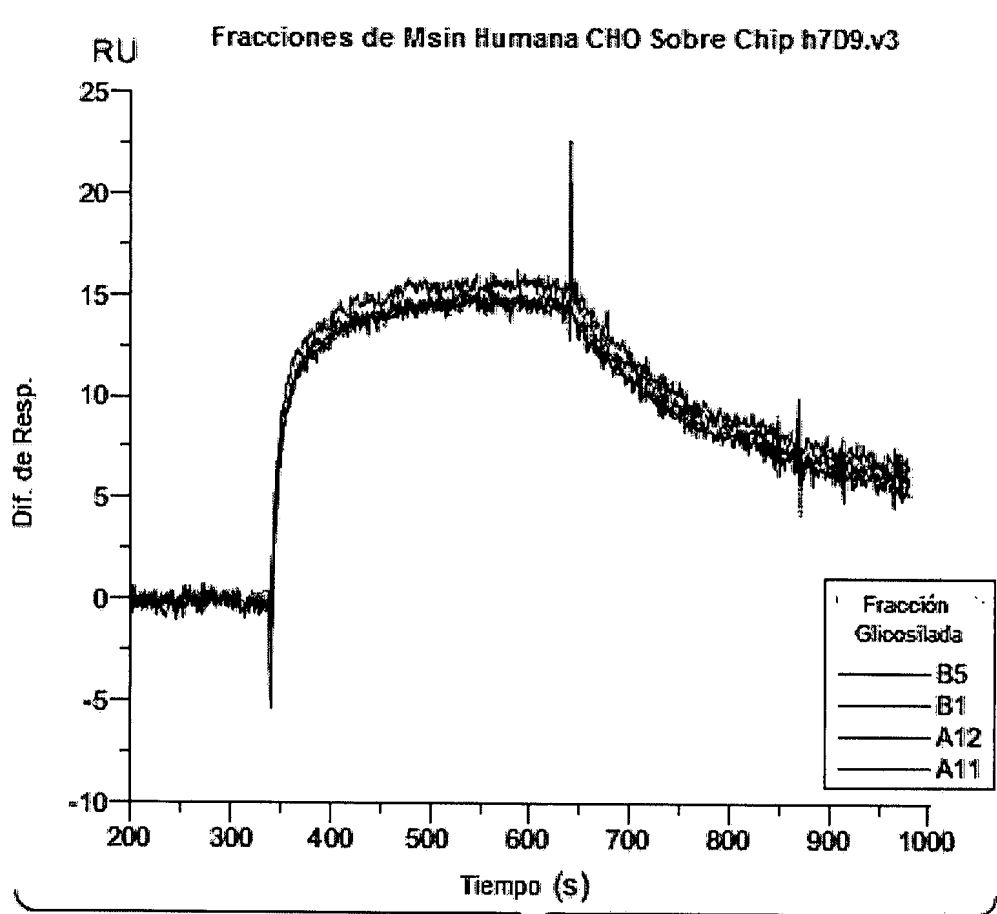
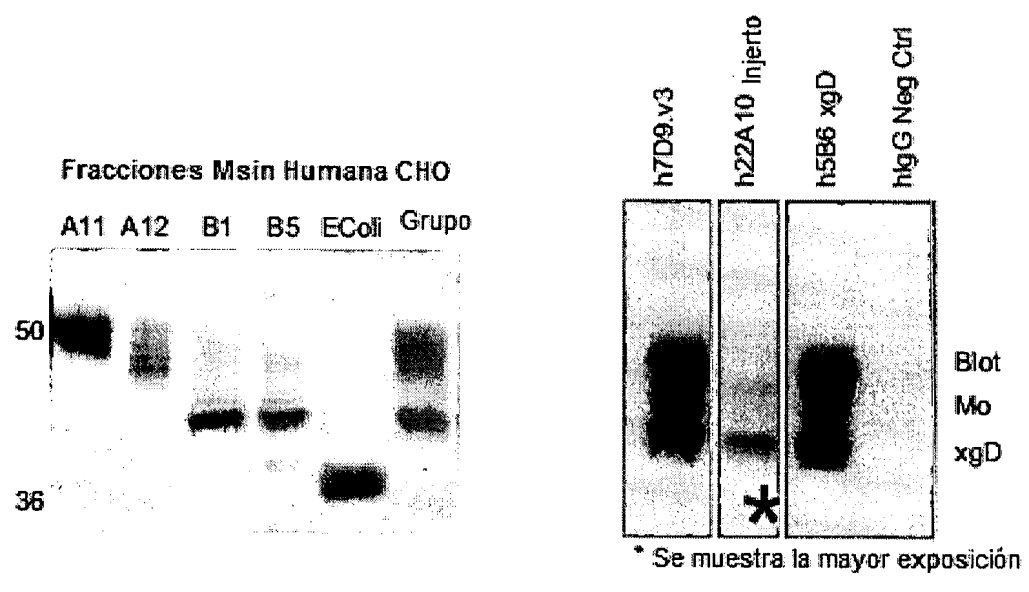
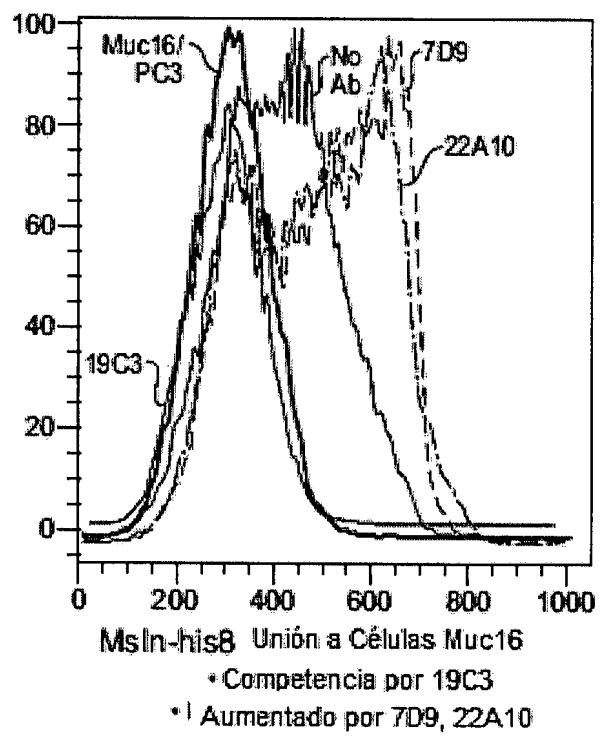
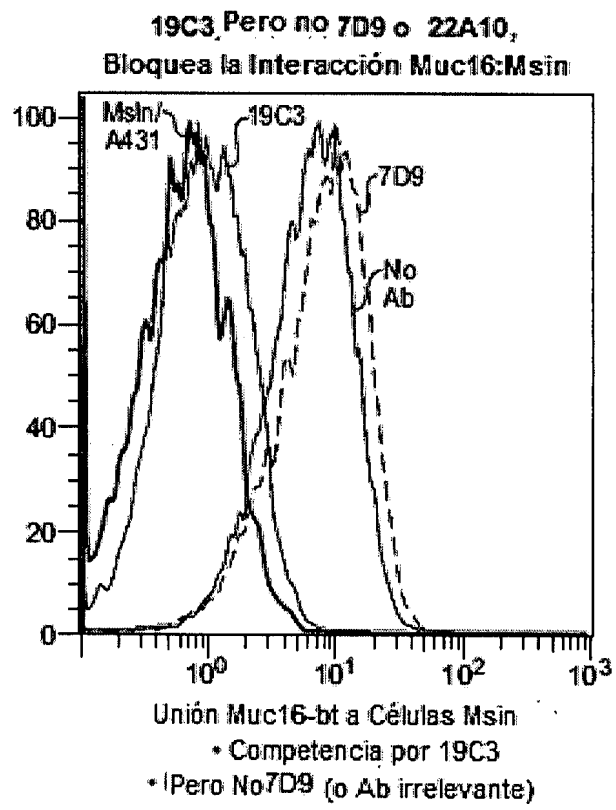


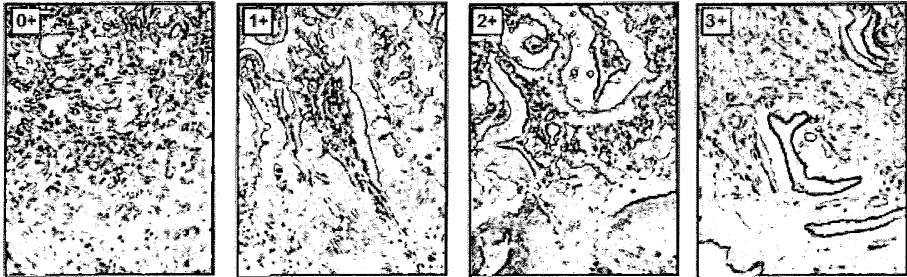
FIG. 20

FIG. 21



Adenocarcinoma Ductal Pancreático IHC Mesotelina (PDAC)

	Puntaje IHC			
	0+	1+	2+	3+
PDAC (N=76)	30%	37%	24%	9%



70% PDAC Positivo 33% ≥ 2+

FIG. 22

Tumores de Ovario IHC Mesotelina

	Puntaje IHC			
	0+	1+	2+	3+
Adeno Seroso (N=43)	2%	23%	44%	30%

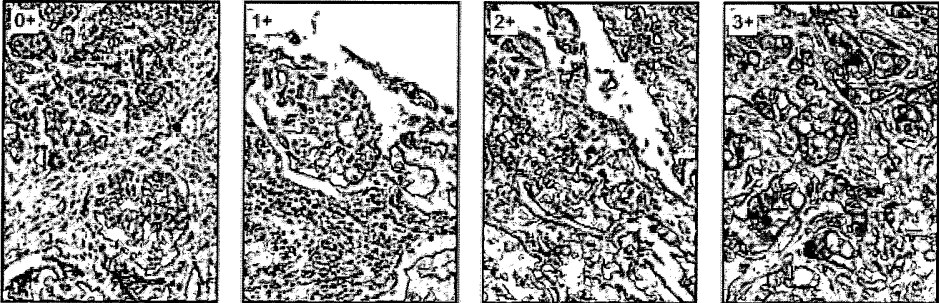


98% Seroso Positivo 74% ≥ 2+ 8/8 Positivo Mets Seroso Unido

FIG. 23

Adenocarcinoma de NSCLC IHC Mesotelina

	Puntaje IHC			
	0+	1+	2+	3+
NSCLC (N=77)	56%	18%	16%	10%



44% NSCLC Positivo. 26% ≥ 2+. 3/8 (38%) Equivalencia Mets Positivo

FIG. 24

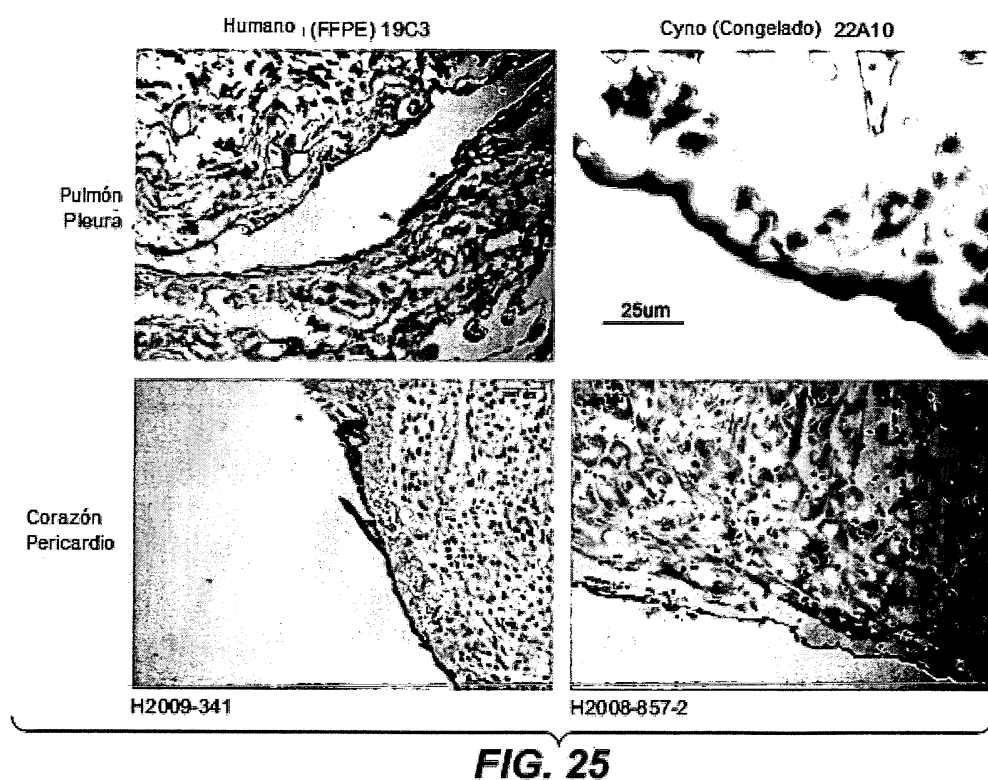


FIG. 25

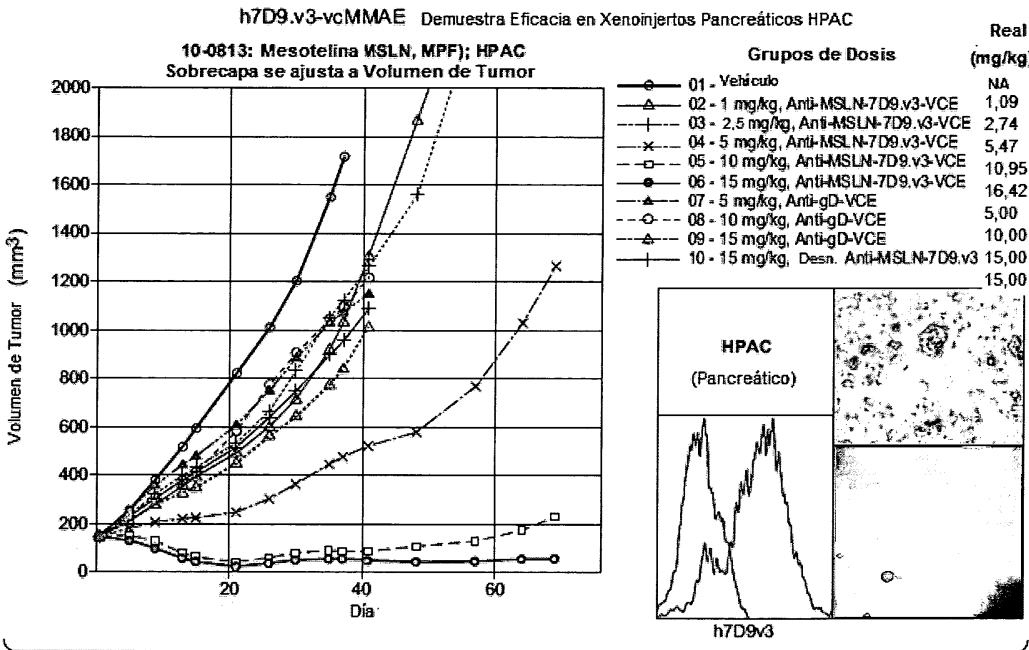
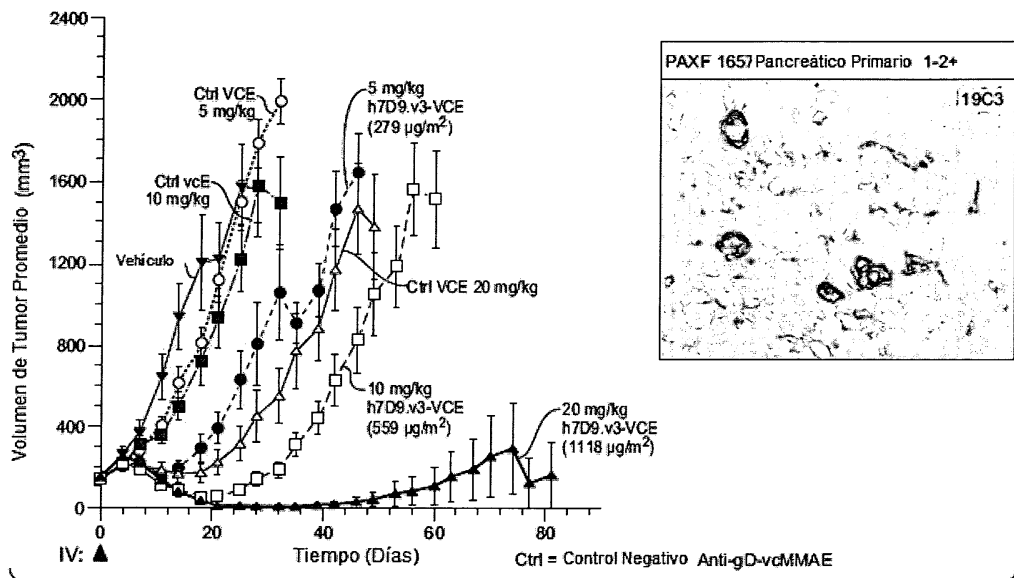


FIG. 26

h7D9.v3-vcMMAE Demuestra Eficacia en Xenoinjerto Pancreático Primario



h7D9.v3-vcMMAE : Demuestra Eficacia en Modelo de Xenoinjerto de Ovario

10-0813 C: Mesotelina(MSLN, MPF); OvCar-3 x2.1
Sobrecapa se ajusta a Volumen de Tumor

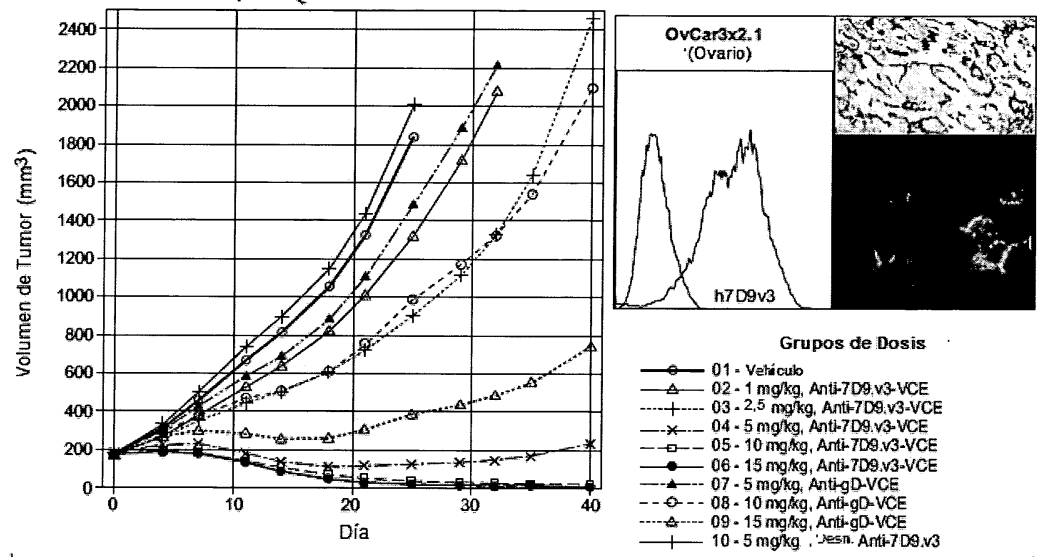


FIG. 28

h7D9.v3-vcMMAE Demuestra Eficacia en Cáncer de Pulmón
(Carcinoma de Célula Escamosa) Modelo de Xenoinjerto

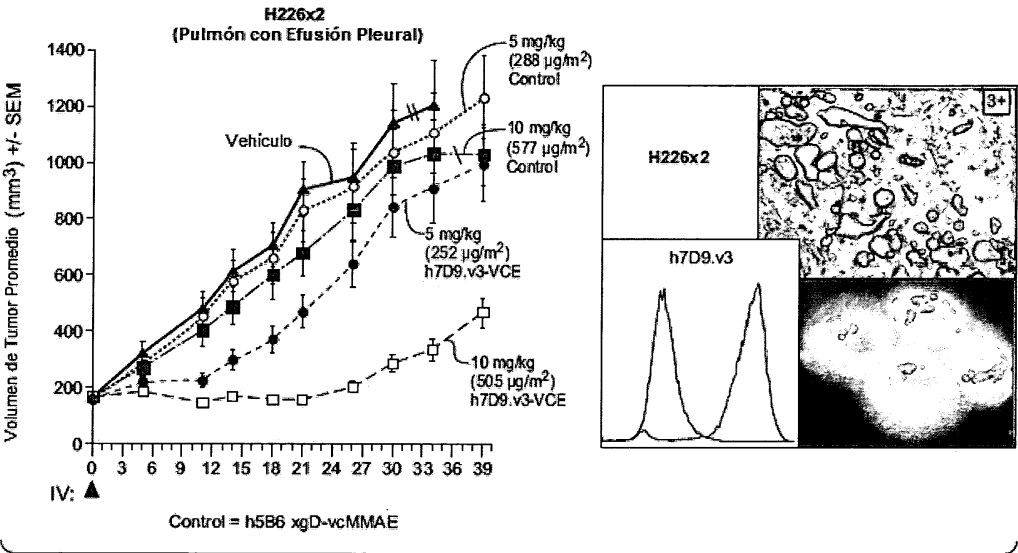


FIG. 29

Eficacia de h7D9.v3-vcMMAE Similar a h22A10-vcMMAE

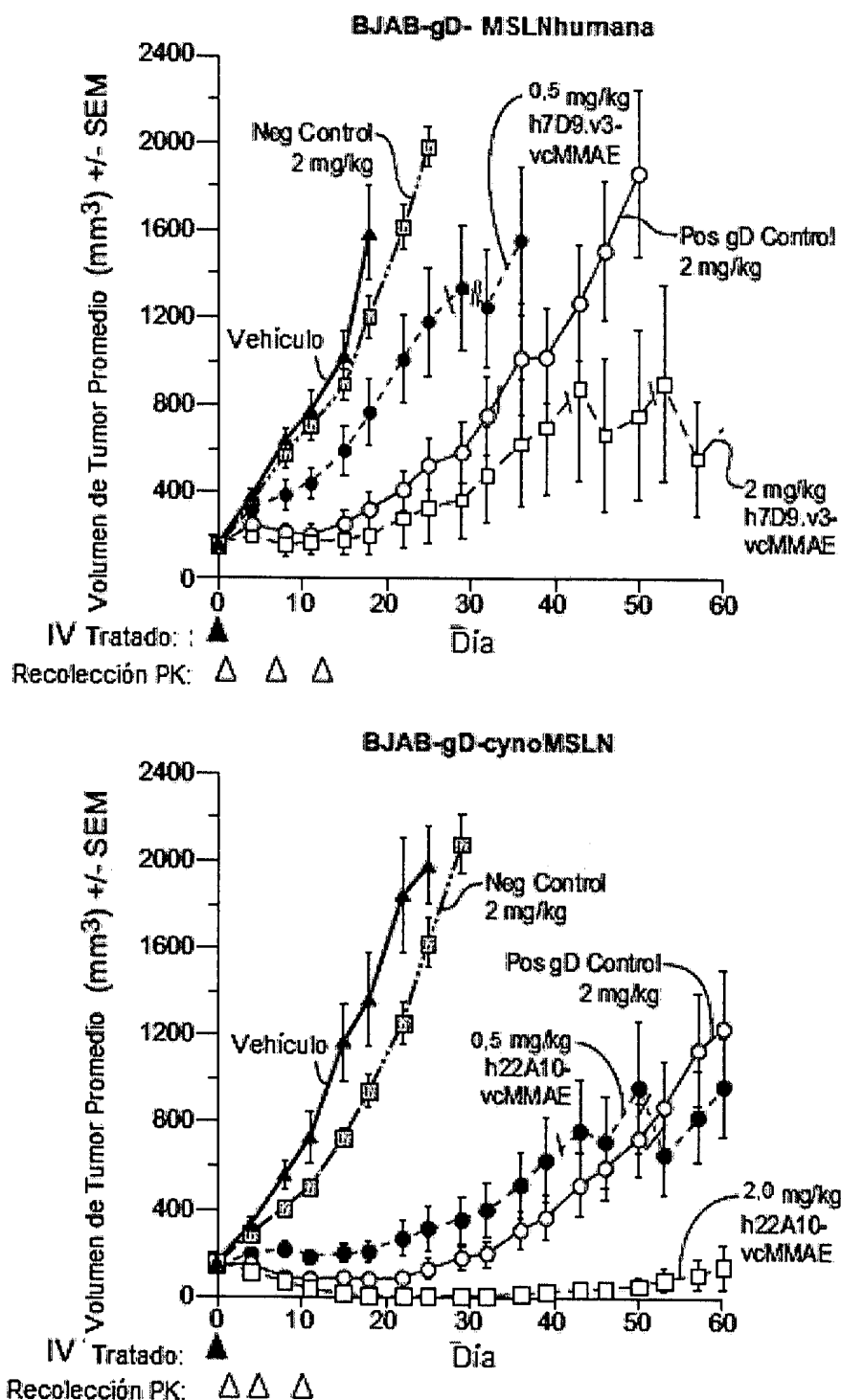


FIG. 30

Eficacia de h7D9.v3-vcMMAE Similar · h22A10-vcMMAE

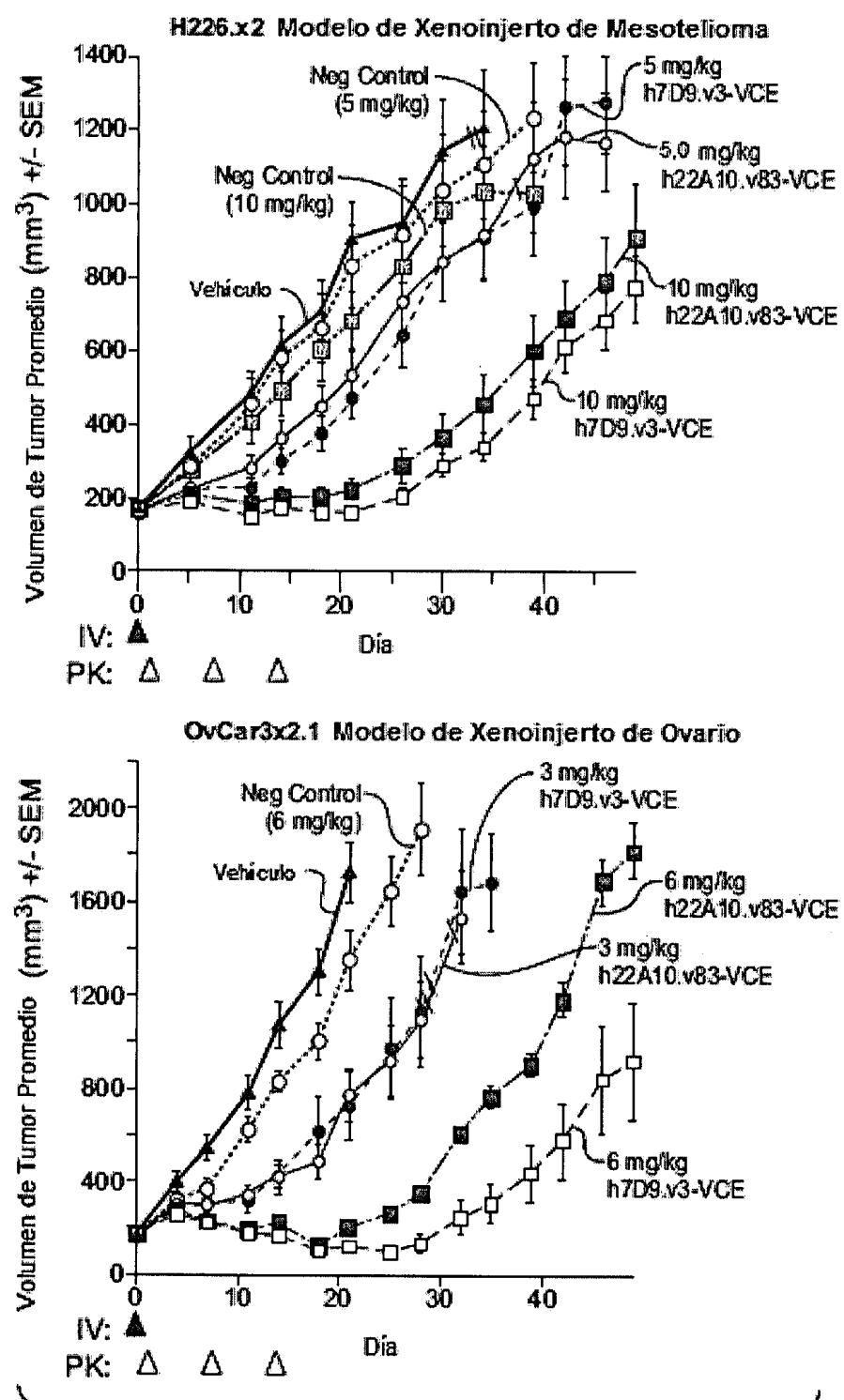
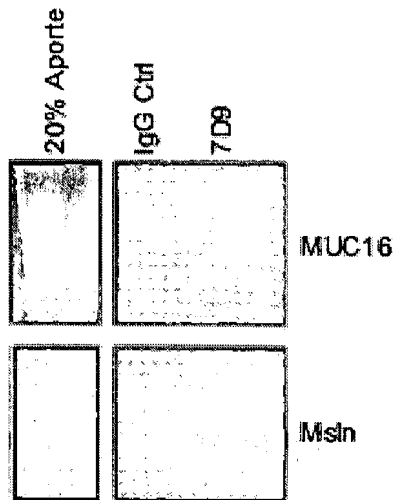


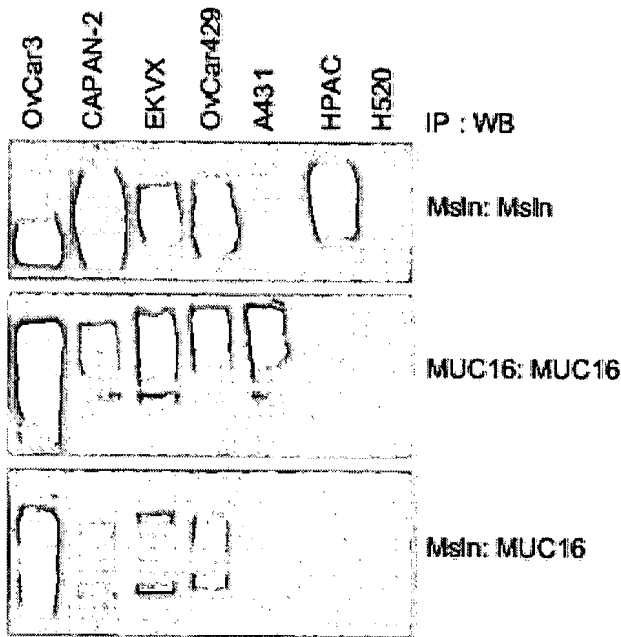
FIG. 31

Complejos MUC16 con Mesotelina,
y Dos Proteínas se Co-circulan
de Líneas Celulares Dual-positivas



Co.inmunoprecipitados de MUC16
con Msln en Lisados Celulares OvCar3

FIG. 32



Medio Acondicionado Muestra la Co-
inmunoprecipitación de Msln con MUC16
Solo de Líneas que Expresan Ambas Proteínas

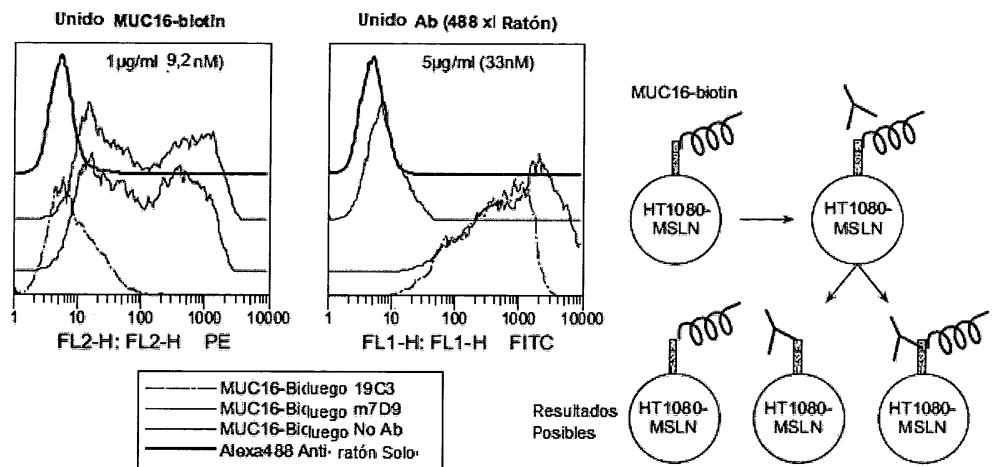


FIG. 33

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> ANTICUERPOS ANTI-MESOTHLINA E INMUNOCONJUGADOS

<130> P4532R1

<140>

<141>

<150> 61/459.962

<151> 2010-12-20

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln
 85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 5
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

<210> 6
<211> 115
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu
100 105 110

Thr Val Ser
115

<210> 7
<211> 115
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 7

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

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

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

Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr val Ser
115

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 8

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

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

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

Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr val Ser
115

<210> 9

<211> 108

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10
<211> 97
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 10
Gly Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
1 5 10 15
Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
20 25 30
Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
35 40 45
Ser Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
50 55 60
Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
85 90 95
Arg

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 13
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 14
Glu Leu Leu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético

<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

85 90 95
Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 17
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 18
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 19
 His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 20
 Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His
 1 5 10

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

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 21
 Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Asp

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 22
 Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 23
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 23
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 24

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 25

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 26

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 27

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 28

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 31
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 31
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 32
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
1 5 10

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 33
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 34
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 35

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

15

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Ser

1510

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 37

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

151015

Lys Gly

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 38

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1510

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 39

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Tyr

1510

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

```

<400> 40
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1      5      10      15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      20      25      30

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
      sintético

<400> 41
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1      5      10

<210> 42
<211> 622
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
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
      65      70      75      80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
      85      90      95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
      100      105      110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
      115      120      125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
      130      135      140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
      145      150      155      160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
      165      170      175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
      180      185      190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
      195      200      205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg

```

210	215	220
Ala 225	Ala Leu Gln Gly 230	Gly Gly Pro Pro Tyr Gly 235
Ser Val Ser Thr	Met 245	Asp Ala Leu Arg Gly 250
Gln Pro Ile 260	Arg Ser Ile Pro 265	Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg 270
Gln Arg Ser 275	Ser Arg Asp Pro 280	Trp Arg Gln Pro Glu 285
Leu Arg 290	Pro Arg Phe Arg 295	Glu Val Glu Lys Thr 300
Gly 305	Lys Lys Ala Arg 310	Glu Ile Asp Glu Ser Leu 315
Trp Glu Leu Glu	Ala 325	Cys Val Asp Ala Ala 330
Asp Arg Val	Asn 340	Ala Ile Pro Phe Thr 345
Lys His 355	Lys Leu Asp Glu Leu 360	Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro 365
Ile 370	Gln His Leu Gly Tyr 375	Leu Phe Leu Lys Met Ser 380
Arg 385	Lys Trp Asn Val Thr 390	Ser Leu Glu Thr Leu 395
Val Asn Lys Gly	His 405	Glu Met Ser Pro Gln Val 410
Arg Phe Val	Lys 420	Gly Arg Gly Gln Leu 425
Leu Thr Ala 435	Phe Tyr Pro Gly Tyr 440	Leu Cys Ser Leu 445
Leu Ser 450	Ser Val Pro Pro 455	Ser Ile Trp Ala Val 460
Leu 465	Asp Thr Cys Asp 470	Pro Arg Gln Leu Asp Val 475
Arg Leu Ala Phe	Gln 485	Asn Met Asn Gly Ser 490
Gln Ser Phe 500	Leu Gly Gly Ala Pro 505	Thr Glu Asp Leu Lys 510
Gln Gln 515	Asn Val Ser Met Asp 520	Leu Ala Thr Phe Met 525
Asp Ala Val 530	Leu Pro Leu Thr 535	Val Ala Glu Val Gln 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

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

<210> 43
<211> 285
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile
1 5 10 15

Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val
20 25 30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser
85 90 95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met
100 105 110

Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly
115 120 125

Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser
145 150 155 160

Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg
165 170 175

Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met
180 185 190

Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala
195 200 205

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp
210 215 220

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr

225 230 235 240
 Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys
 245 250 255
 Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg
 260 265 270
 Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly
 275 280 285

 <210> 44
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 44
 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
 65 70 75 80

 Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85 90 95

 Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
 100 105 110

 Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
 115 120 125

 Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
 130 135 140

 Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
 145 150 155 160

 Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 165 170 175

 Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
 180 185 190

 Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 195 200 205

 Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
 210 215 220

 Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240

 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255

Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 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 Ala Pro Arg Arg Pro Leu
 405 410 415
 Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln
 420 425 430
 Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr
 435 440 445
 Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser
 450 455 460
 Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln
 465 470 475 480
 Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn
 485 490 495
 Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro
 500 505 510
 Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu
 515 520 525
 Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val
 530 535 540
 Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala
 545 550 555 560
 Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln
 565 570 575
 Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn

580 585 590
 Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr
 595 600 605
 Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu
 610 615 620
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala
 625 630

 <210> 45
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 45
 Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile
 1 5 10 15
 Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val
 20 25 30
 Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro
 35 40 45
 Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu
 50 55 60
 Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser
 85 90 95
 Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met
 100 105 110
 Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile
 115 120 125
 Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp
 130 135 140
 Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu
 145 150 155 160
 Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln
 165 170 175
 Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys
 180 185 190
 Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys
 195 200 205
 Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu
 210 215 220
 Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg
 225 230 235 240
 Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu
 245 250 255

Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val
260 265 270

Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly
275 280 285

Leu Gly Leu Gln Gly
290

<210> 46

<211> 285

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 46

Asp Val Glu Arg Thr Thr Cys Pro Pro Glu Lys Glu Val His Glu Ile
1 5 10 15

Asp Glu Asn Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Arg Glu Leu Glu Ala Cys Val
20 25 30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Gln Met Asp Arg Val Asp Ala Ile Pro
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Arg His Leu Gly His Leu
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser
85 90 95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly His Glu Met
100 105 110

Ser Ala Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Val Val Val Gly Arg Gly
115 120 125

Gln Leu Asp Lys Asp Thr Val Asp Thr Leu Thr Ala Phe Cys Pro Gly
130 135 140

Cys Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Arg Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser
145 150 155 160

Val Ile Gly Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Gly Pro Arg
165 170 175

Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met
180 185 190

Ser Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Arg Pro Phe Leu Gly Gly Ala
195 200 205

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp
210 215 220

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Arg Glu Ala Val Leu Pro Leu Thr
225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys
245 250 255

Val Glu Glu Gln His Ser Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Lys Gln Arg
260 265 270

Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly
275 280 285

<210> 47
<211> 285
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 47
Asp Thr Glu Gln Lys Ala Cys Pro Pro Gly Lys Glu Pro Asn Val Val
1 5 10 15

Asp Glu Asn Leu Ile Phe Tyr Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val
20 25 30

Asp Gly Thr Leu Leu Ala Gly Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Leu Ile Lys Gln Leu Gly His Phe
65 70 75 80

Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu Asp Ile Arg Gln Trp Asn Val Thr Ser
85 90 95

Pro Asp Thr Val Asn Thr Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met
100 105 110

Asp Ala Gln Val Ile Ala Leu Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly
115 120 125

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

Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ala Ile Pro Ser Ser
145 150 155 160

Val Met Trp Leu Val Gly Leu His Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg
165 170 175

His Leu Gly Ile Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val
180 185 190

Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Ala
195 200 205

Ser Arg Glu Asp Leu Arg Ala Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp
210 215 220

Ile Ala Thr Phe Lys Lys Leu Gln Val Asp Ala Leu Val Gly Leu Ser
225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Ile Gly Asp Leu Lys
245 250 255

Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln Gln
260 265 270

Gln Lys Asp Leu Asp Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly
275 280 285

<210> 48
<211> 285
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 48
Asp Ala Glu Gln Lys Ala Cys Pro Pro Gly Lys Glu Pro Tyr Lys Val
1 5 10 15

Asp Glu Asp Leu Ile Phe Tyr Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val
20 25 30

Asp Gly Thr Met Leu Ala Arg Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Leu Ile Gln Gln Leu Gly His Phe
65 70 75 80

Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu Asp Ile His Gln Trp Asn Val Thr Ser
85 90 95

Pro Asp Thr Val Lys Thr Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met
100 105 110

Asn Ala Gln Ala Ile Ala Leu Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly
115 120 125

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

Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser
145 150 155 160

Val Met Trp Leu Val Gly Pro Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg
165 170 175

His Leu Gly Leu Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val
180 185 190

Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala
195 200 205

Ser Val Lys Asp Leu Arg Ala Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp
210 215 220

Ile Ala Thr Phe Lys Arg Leu Gln Val Asp Ser Leu Val Gly Leu Ser
225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu Lys
245 250 255

Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln His
260 265 270

Gln Lys Asp Leu Asp Arg Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly
275 280 285

<210> 49

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

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 8xHis etiqueta sintética

<400> 49
His His His His His His His His
1 5

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 6xHis etiqueta sintética

<400> 50
His His His His His His
1 5

<210> 51
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Glu Val Glu Lys
1

<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 52
Asp Ala Glu Gln
1

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 53
Asp Val Glu Arg
1

<210> 54
<211> 81
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys
1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp
20 25 30

Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp
35 40 45

Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser
50 55 60

Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu
65 70 75 80

Asp

<210> 55
<211> 81
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 55
Lys Asp Thr Val Asp Thr Leu Thr Ala Phe Cys Pro Gly Cys Leu Cys
1 5 10 15
Ser Leu Ser Pro Glu Arg Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Val Ile Gly
20 25 30
Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Gly Pro Arg Gln Leu Asp
35 40 45
Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Ser Gly Ser
50 55 60
Glu Tyr Phe Val Lys Ile Arg Pro Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu
65 70 75 80

Asp

<210> 56
<211> 81
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 56
Glu Asp Ile Val Lys Ala Leu Asp Asn Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys
1 5 10 15
Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ala Ile Pro Ser Ser Val Met Trp
20 25 30
Leu Val Gly Leu His Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly
35 40 45
Ile Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu
50 55 60
Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Arg Glu
65 70 75 80

Asp

<210> 57
<211> 81
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 57
Glu Asp Met Val Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys
1 5 10 15
Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser Val Met Trp
20 25 30
Leu Val Gly Pro Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly
35 40 45
Leu Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu

165
166

50	55	60
Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Val Lys		
65	70	75 80

Asp

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Lys Asp Thr Leu
1

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 59
Glu Asp Met Val
1

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Thr Ala Phe Tyr
1

<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 61
Gly Asp Ile Pro
1

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Glu Glu Leu Ser
1

<210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 63
Gln Asp Leu His
1

<210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Pro Ser Ser Ile
1

<210> 65
<211> 4

<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 65
Ser Ser Val Met
1

<210> 66
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Thr Cys Asp Pro
1

<210> 67
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 67
Lys Cys Ser Gln
1

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Gln Leu Asp Val Leu
1 5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 69
His Leu Gly Leu Leu
1 5

<210> 70
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Met Asn Gly Ser
1

<210> 71
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 71
Val Ser Gly Leu
1

<210> 72
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Pro Thr Glu Asp
1

<210> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 73
Ser Thr Lys Asp
1

<210> 74
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 74
Ser Val Lys Asp
1

160
69

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990**
USA

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California**
USA

this 6th day of December 2005

Signature

Name **Timothy R. Schwartz, Ph.D.**
Title **Section Patent Counsel**
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.

189
170

P4532R1-WO



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 9, 2012

PTAS

DANIELLE M. PASQUALONE
1 DNA WAY
MS 49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

501778602

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/06/2012

REEL/FRAME: 027495/0100
NUMBER OF PAGES: 8

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: P4532R1-WO

ASSIGNOR:
DENNIS, MARK

DOC DATE: 12/09/2011

ASSIGNOR:
SCALES, SUZANNA J.

DOC DATE: 12/08/2011

ASSIGNOR:
SPENCER, SUSAN D.

DOC DATE: 12/14/2011

ASSIGNOR:
ZHANG, YIN

DOC DATE: 12/09/2011

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
MS 49
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

180
171

027495/0100 PAGE 2

APPLICATION NUMBER:
PATENT NUMBER:
PCT NUMBER: US1165895
TITLE:

FILING DATE:
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

501778602 01/06/2012

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
 Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT												
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT												
CONVEYING PARTY DATA													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 70%;">Name</th> <th style="width: 30%;">Execution Date</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mark Dennis</td> <td>12/09/2011</td> </tr> <tr> <td>Suzanna J. Scales</td> <td>12/08/2011</td> </tr> <tr> <td>Susan D. Spencer</td> <td>12/14/2011</td> </tr> <tr> <td>Yin Zhang</td> <td>12/09/2011</td> </tr> </tbody> </table>		Name	Execution Date	Mark Dennis	12/09/2011	Suzanna J. Scales	12/08/2011	Susan D. Spencer	12/14/2011	Yin Zhang	12/09/2011		
Name	Execution Date												
Mark Dennis	12/09/2011												
Suzanna J. Scales	12/08/2011												
Susan D. Spencer	12/14/2011												
Yin Zhang	12/09/2011												
RECEIVING PARTY DATA													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">Name:</td> <td>Genentech, Inc.</td> </tr> <tr> <td>Street Address:</td> <td>1 DNA WAY</td> </tr> <tr> <td>Internal Address:</td> <td>MS 49</td> </tr> <tr> <td>City:</td> <td>South San Francisco</td> </tr> <tr> <td>State/Country:</td> <td>CALIFORNIA</td> </tr> <tr> <td>Postal Code:</td> <td>94080</td> </tr> </table>		Name:	Genentech, Inc.	Street Address:	1 DNA WAY	Internal Address:	MS 49	City:	South San Francisco	State/Country:	CALIFORNIA	Postal Code:	94080
Name:	Genentech, Inc.												
Street Address:	1 DNA WAY												
Internal Address:	MS 49												
City:	South San Francisco												
State/Country:	CALIFORNIA												
Postal Code:	94080												
PROPERTY NUMBERS Total: 1													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 35%;">Property Type</th> <th style="width: 65%;">Number</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCT Number:</td> <td>US1165895</td> </tr> </tbody> </table>		Property Type	Number	PCT Number:	US1165895								
Property Type	Number												
PCT Number:	US1165895												
CORRESPONDENCE DATA													
Fax Number: (650)952-9881 Phone: 650-467-0594 Email: pasqualone.danielle@gene.com <i>Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.</i> Correspondent Name: Danielle M. Pasqualone Address Line 1: 1 DNA Way Address Line 2: MS 49 Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080													
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	P4532R1-WO												
NAME OF SUBMITTER:	Danielle M. Pasqualone												

CH \$40.00 US1165895

Docket No. P4532R1-WO

ASSIGNMENT

WHEREAS, Mark DENNIS, Suzanna J. SCALES, Susan D. SPENCER, and Yin ZHANG (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-MESOTHELIN ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES

for which an International Patent Application Serial No. PCT/US11/65895¹ (Docket No. P4532R1-WO) has been filed by them on 12/19/2011, which application claims the benefit of Serial No. 61/459962; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

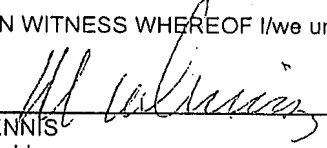
The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

¹ Assignors hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

123
174

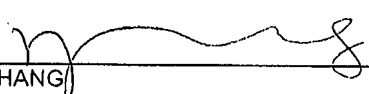
IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

 12/9/11

Mark DENNIS Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: United States of America (US)

Suzanna J. SCALES Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: United Kingdom (GB)

Susan D. SPENCER Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: United States of America (US)

 12/9/11

Yin ZHANG Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: China (CN)

ASSIGNMENT

WHEREAS, Mark DENNIS, Suzanna J. SCALES, Susan D. SPENCER, and Yin ZHANG (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-MESOTHELIN ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES

for which an International Patent Application Serial No. PCT/US11/65895¹ (Docket No. P4532R1-WO) has been filed by them on 12/19/2011, which application claims the benefit of Serial No. 61/459962; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

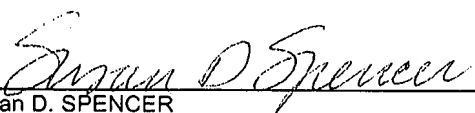
¹ Assignors hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

125
126

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Mark DENNIS	Date
Mailing address:	
1 DNA Way	
South San Francisco, CA 94080	
Citizenship: United States of America (US)	

Suzanna J. SCALES	Date
Mailing address:	
1 DNA Way	
South San Francisco, CA 94080	
Citizenship: United Kingdom (GB)	

	Dec. 14, 2011
Susan D. SPENCER	Date
Mailing address:	
1 DNA Way	
South San Francisco, CA 94080	
Citizenship: United States of America (US)	

Yin ZHANG	Date
Mailing address:	
1 DNA Way	
South San Francisco, CA 94080	
Citizenship: China (CN)	

ASSIGNMENT

WHEREAS, Mark DENNIS, Suzanna J. SCALES, Susan D. SPENCER, and Yin ZHANG (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-MESOTHELIN ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES

for which an International Patent Application Serial No. PCT/US11/65895¹ (Docket No. P4532R1-WO) has been filed by them on 12/19/2011, which application claims the benefit of Serial No. 61/459962; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

¹ Assignors hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Mark DENNIS	Date
Mailing address:	
1 DNA Way	
South San Francisco, CA 94080	
Citizenship: United States of America (US)	

<i>Suzanna Scales</i>	<i>12.8.11</i>
Suzanna J. SCALES	Date
Mailing address:	
1 DNA Way	
South San Francisco, CA 94080	
Citizenship: United Kingdom (GB)	

Susan D. SPENCER	Date
Mailing address:	
1 DNA Way	
South San Francisco, CA 94080	
Citizenship: United States of America (US)	

Yin ZHANG	Date
Mailing address:	
1 DNA Way	
South San Francisco, CA 94080	
Citizenship: China (CN)	

138
139

**TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A
GENENTECH, INC., firmado por los cedentes y el cesionario.**

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES ESTADOS UNIDOS
Bajo el Secretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Marcas y Patentes
de los Estados Unidos

Enero 9, 2012

PTAS

DANIELLE M. PASQUALONE
1 DNA Way
MS 49
South San Francisco, CA 94080

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos
Notificación de Registro de Documento de Cesión

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos. Una copia microfilmada completa se encuentra disponible en la Sala de Búsquedas de Cesiones en el rollo y cuadro cuyo nombre de referencia aparece más adelante.

Por favor revise toda la información que contiene esta notificación. La información contenida refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Marcas y Patentes. Si encuentra errores o tiene preguntas con respecto a este documento, puede contactar al funcionario cuyo nombre aparece en esta notificación, marcando el 571-272-3350. Las solicitudes de corrección se pueden enviar a: U.S. Patent and Trademark Office, Mail Stop: Assignment Services Branch, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313.

Fecha de Registro: 01/06/2012

Rollo/Cuadro: 027495/0100
Número de páginas: 8

Resumen: Cesión de interés del cedente (véase documento para detalles)

Número de Expediente de Abogado: P4532R1-WO

Cedente:
DENNIS, Mark

Fecha del documento: 12/09/2011

Cedente:
SCALES, Suzanna J.

Fecha del documento: 12/08/2011

Cedente:
SPENCER, Susan D.

Fecha del documento: 12/14/2011

Cedente:
ZHANG, Yin

Fecha del documento: 12/09/2011

Cesionario:
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
MS 49
South San Francisco, CA 94080

129
12

Página 2

Número de solicitud:
Número de patente:
Número PCT: US1165895

Fecha de presentación:
Fecha de expedición:

Título:

SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESIONES
DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

180
181

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE	
Nombre	Fecha de ejecución
Mark Dennis	12/09/2011
Suzanna J. Scales	12/08/2011
Susan D. Spencer	12/14/2011
Yin Zhang	12/09/2011

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección interna:	MS 49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080

NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número PCT:	US1165895

DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número de Fax:	(650) 952 9881
Teléfono:	650 467 0594
Correo electrónico:	pasqualone.danielle@gene.com
<i>La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.</i>	
Nombre del destinatario:	Danielle M. Pasqualone
Dirección Línea 1:	1 DNA Way
Dirección Línea 2:	MS#49
Dirección Línea 4:	South San Francisco, CALIFORNIA 94080
NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	P4532R1-WO
NOMBRE DEL REMITENTE:	Danielle M. Pasqualone

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Mark Dennis, Suzanna J. Scales, Susan D. Spencer y Yin Zhang** (cada uno de ellos un "CEDENTE"); han inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPOS ANTI-MESOTELINA E INMUNOCONJUGADOS

para la cual se presentó una solicitud de patente internacional con Serial No. PCT/US2011/65895¹(Expediente de abogado No. P4532R1-WO) el 19 de diciembre de 2011; cuya solicitud reivindica el beneficio del Serial No. 61/459962; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

¹ Los cedentes por la presente autorizan a GENENTECH, INC. y sus representantes y designados a ingresar la información del número de solicitud y fecha de presentación cuando se conozcan.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

(firma)
MARK DENNIS
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Ciudadanía: Estados Unidos de América (US)

12/09/2011

Fecha

SUZANNA J. SCALES
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Ciudadanía: Reino Unido (GB)

Fecha

SUSAN D. SPENCER
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Ciudadanía: Estados Unidos de América (US)

Fecha

(firma)
YIN ZHANG
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Ciudadanía: China (CN)

12/09/2011

Fecha

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Mark Dennis, Suzanna J. Scales, Susan D. Spencer y Yin Zhang** (cada uno de ellos un "CEDENTE"); han inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPOS ANTI-MESOTELINA E INMUNOCONJUGADOS

para la cual se presentó una solicitud de patente internacional con Serial No. PCT/US2011/65895²(Expediente de abogado No. P4532R1-WO) el 19 de diciembre de 2011; cuya solicitud reivindica el beneficio del Serial No. 61/459962; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

² Los cedentes por la presente autorizan a GENENTECH, INC. y sus representantes y designados a ingresar la información del número de solicitud y fecha de presentación cuando se conozcan.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

<u>MARK DENNIS</u> Dirección de correspondencia: 1 DNA Way South San Francisco, CA 94080 Ciudadanía: Estados Unidos de América (US)	<u>Fecha</u>
---	--------------

<u>SUZANNA J. SCALES</u> Dirección de correspondencia: 1 DNA Way South San Francisco, CA 94080 Ciudadanía: Reino Unido GB)	<u>Fecha</u>
--	--------------

<u>(firma)</u> SUSAN D. SPENCER Dirección de correspondencia: 1 DNA Way South San Francisco, CA 94080 Ciudadanía: Estados Unidos de América (US)	<u>12/14/2011</u> Fecha
---	----------------------------

<u>YIN ZHANG</u> Dirección de correspondencia: 1 DNA Way South San Francisco, CA 94080 Ciudadanía: China (CN)	<u>Fecha</u>
---	--------------

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Mark Dennis, Suzanna J. Scales, Susan D. Spencer y Yin Zhang** (cada uno de ellos un "CEDENTE"); han inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPOS ANTI-MESOTELINA E INMUNOCONJUGADOS

para la cual se presentó una solicitud de patente internacional con Serial No. PCT/US2011/65895³(Expediente de abogado No. P4532R1-WO) el 19 de diciembre de 2011; cuya solicitud reivindica el beneficio del Serial No. 61/459962; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

³ Los cedentes por la presente autorizan a GENENTECH, INC. y sus representantes y designados a ingresar la información del número de solicitud y fecha de presentación cuando se conozcan.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

MARK DENNIS
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Ciudadanía: Estados Unidos de América (US)

Fecha

(firma)
SUZANNA J. SCALES
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Ciudadanía: Reino Unido GB)

12/08/2011
Fecha

SUSAN D. SPENCER
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Ciudadanía: Estados Unidos de América (US)

Fecha

YIN ZHANG
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Ciudadanía: China (CN)

Fecha



107
185

**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

Ms. Danielle M Pasqualone,
Genentech Inc
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Deposited on Behalf of: **Genentech Inc**

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: **November 09, 2010**

Identification Reference by Depositor: ATCC ®Patent Deposit Designation: Quantity Received:

Mouse Hybridoma: MPF:3542 (19C3.1.2) PTA-11464 25 vials

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.



The deposit was tested **November 29, 2010** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Latha Ramakrishnan
Digitally signed by Latha Ramakrishnan
DN: cn=Latha Ramakrishnan, o=ATCC, ou=IPLS
Department, email=lramakrishnan@atcc.org, ce=US
Date: 2010.12.01 10:41:06 -0500

December 01, 2010

ATCC® Patent Depository

Date

Ref: Docket or Case No. PR4532

124843 133 109 190

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

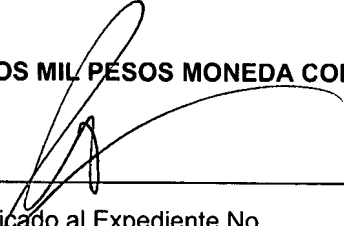
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0041751
		Bogotá D.C., Mayo 03 de 2013 - 12:33:21

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.	NI 860.047.372
-------------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513231	02/05/2013	11.213.400.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-135221- -00000-0000
Fecha: 2013-06-04 15:58:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 190

19/10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0053646
		Bogotá D.C., Junio 04 de 2013 - 15:42:00

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	41756	03/05/2013		600.000.00
RECIBO DE CA	999999999	46941	15/05/2013		1.200.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
60 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	1.800.000.00
			<u>\$1.800.000.00</u>

SON: **UN MILL&OACUTE;N OCHOCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-135221- -00000-0000
Fecha: 2013-06-04 15:58:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~198~~ 191

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
☐	Completa ☐
	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
☒	Completa ☒
	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
☐	Completa ☐
	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
☐	Completa ☐
	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-135221-00000-0000

Fecha: 2013-06-04 15:58:18
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 190 (2)

PI02-F08 (2009-11-18)