



No. 13-274153- -00000-0000

Fecha: 2013-11-21 15:58.53

Dep. 2020 DIR.NUEVASCREAC

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios. 4



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"INMUNOTOXINA RECOMBINANTE
DIRIGIDA A LA MESOTELINA"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 39/00**

71. SOLICITANTE **THE GOVERNMENT OF THE UNITED
STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES**

DOMICILIO **ROCKVILLE, ESTADO DE MARYLAND,
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **21 NOV 2013**

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-274153- -00000-0000 Fecha: 2013-11-21 15:58:53 Dep. 2020 DIR NUEVASCREAC Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act 411 PRESENTACION Folios. 4	dicación
--	---	-----------------

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	(12) 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/US2012/036456	Fecha 04/05/12
Publicación Internacional No.		WO 2012/154530 A1	Fecha 15/11/12
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCION:		
"INMUNOTOXINA RECOMBINANTE DIRIGIDA A LA MESOTELINA"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
A61K 39/00			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
4. THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		6011 Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, MD 20852-3804, Estados Unidos de América	
CIUDAD		Rockville	
DEPARTAMENTO/ESTADO		Maryland	
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	
No. TELÉFONO		3264270	
E-MAIL		notificacionespatentes@lloredacamacho.com	
NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN			
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. PASTAN 2. WELDON 3. BEERS		Ira, H. John Richard	Estados Unidos de América
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Estados Unidos de América	Maryland	Potomac Columbia Rockville	1. 11710 Beall Mountain Road, Potomac, Maryland 20854, Estados Unidos de América. 2. 10624 Spotted Horse Lane, Columbia, Maryland 21044, Estados Unidos de América. 3. 306 Russett Road, Rockville, Maryland 20853, Estados Unidos de América.
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P .53.215
DIRECCIÓN		Calle 72 No 5-83 Piso 5to No. TELÉFONO 3264270	
CIUDAD		Bogotá E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com	
PAÍS		Colombia No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/483,531	11/05/06
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 expedido por la Autoridad competente.				
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	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar	
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.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°13-117409	Fecha: 18-11-2013	
15	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>			
 ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios: 93		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 24		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 12		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. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		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.		

- **VER ANEXO CD**
-

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>13</u> / <u>11</u> / <u>21</u> / AAAA MM DD	
		Recorrido: 3	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-274153-	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
☒	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: El CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 10 ARCHIVOS 10 EN FORMATO P.D.F, LOS CUALES FUERON PROCESADOS. UBICADO EN el folio 3.

CE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 117409

Bogotá D.C., Noviembre 18 de 2013 - 16:49:09

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	590198696	18/11/2013	19.295.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	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. 13-274153- -00000-0000

Fecha: 2013-11-21 15:58:53 Dep. 2020 DIR. NUEVASCREAC
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 18 de 2013 - 16:49:14



No. 13-274153- -00000-0000

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UT

Fecha: 2013-11-21 15:58:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCREAC
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

☐	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 ☐	

INMUNOTOXINA RECOMBINANTE DIRIGIDA A LA MESOTELINA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La mesotelina es un antígeno de diferenciación presente en la superficie de los cánceres de ovario, mesoteliomas y varios otros tipos de cánceres humanos. Puesto que entre los tejidos normales, la mesotelina está presente solo en las células mesoteliales, representa un buen blanco para la entrega de agentes citotóxicos mediada por anticuerpo. La presente invención está dirigida a mejores inmunotoxinas recombinantes que comprenden anticuerpos anti-mesotelina, incluyendo moléculas Fv con afinidad particularmente alta por la mesotelina, y una mitad de Exotoxina de Pseudomonas, que ha sido modificada para reducir su inmunogenicidad y la sensibilidad a la proteasa, y proporcionan una mejor citotoxicidad para las células que expresan la mesotelina. Las RIT son adecuadas para el tratamiento de cánceres de ovarios, estómago, células escamosas, mesoteliomas y otras células malignas que expresan la mesotelina.

SECTOR: Química Farmacéutica, específicamente inmunotoxinas recombinantes que comprenden anticuerpos anti-mesotelina, composiciones farmacéuticas que los comprenden. Útiles en el tratamiento del cáncer de ovario, estomago, células escamosas, mesoteliomas y otras células malignas que expresan la mesotelina.

INMUNOTOXINA RECOMBINANTE DIRIGIDA A LA MESOTELINA

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente provisional de Estados Unidos Serie N° 61/483531, presentada el 6 de mayo de 2011, y que es incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN EN CUANTO A LOS DERECHOS A LAS INVENCIONES

REALIZADAS BAJO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

PATROCINADOS FEDERALMENTE

NO PERTINENTE

REFERENCIA A UN “LISTADO DE SECUENCIAS”, UNA TABLA, O

UN APÉNDICE DE LISTADO DE PROGRAMAS COMPUTACIONALES

PRESENTADO EN UN DISCO COMPACTO

NO PERTINENTE

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las inmunotoxinas recombinantes (RIT) son proteínas terapéuticas creadas mediante ingeniería que combinan un fragmento de anticuerpo con una proteína citotóxica derivada de una fuente bacteriana o de planta. Las RIT están diseñadas para ser agentes selectivos para la eliminación dirigida de células sin muchas de las toxicidades secundarias asociadas a las estrategias quimioterapéuticas. Se pueden construir las RIT para el tratamiento de los cánceres fusionando el fragmento variable (Fv) de los anticuerpos contra antígenos de la superficie celular asociados a tumores con un fragmento de exotoxina A de *Pseudomonas* (PE). Las RIT que usan un truncamiento de exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38) de 38 kDa han logrado éxitos notables en los estudios clínicos, pero tienen limitaciones que incluyen una penetración deficiente de los tumores sólidos, una alta inmunogenicidad, y toxicidades no específicas (Kreitman RJ et al., *Clin Cancer Res.*, 15(16): 5274-9 (2009), Hassan R et al., *Clin Cancer Res.*, 13(17): 5144-9 (2007), Wayne AS et al., *Clin Cancer Res.*, 16(6): 1894-903 (2010), Kreitman RJ et al., *J Clin Oncol*, 7(18): 2983-90 (2009), Sampson JH

et al., *Neuro Oncol*, 10(3): 320-9 (2008), Powell DJ Jr et al., *J Immunol*, 179(7): 4919-28 (2007), Kreitman RJ, *J Clin Oncol*, 23(27): 6719-29 (2005), Pal LH et al., *Nat Med.*, 2(3): 350-3 (1996)).

En un esfuerzo por mejorar el resultado del tratamiento con RIT, es importante tener conocimiento de la vía de intoxicación de la PE para comprender el diseño de estas proteínas. Las RIT se internalizan mediante endocitosis mediada por receptor y tráfico a través del sistema endolisosomal hacia el Golgi, donde experimentan transporte retrógrado hacia el retículo endoplasmático (ER). Durante esta etapa de tráfico, se activa la toxina a través de la reducción de un enlace disulfuro y corte realizado por la proteasa furina en un sitio en la PE38, que separa el Fv del fragmento PE. Posteriormente, la PE activada debe translocarse al citosol, donde ribosila el ADP e inactiva el factor de elongación 2, un componente esencial del aparato de traducción. Esto detiene la síntesis de la proteína y eventualmente conduce a la muerte celular (para revisar la vía de intoxicación de la PE consulte 9). Las estrategias previas diseñadas para mejorar la actividad citotóxica de las RIT a base de PE incluyen la sustitución de los residuos C-terminales de la PE, REDLK (SEQ ID NO: 15), por la señal de retención de ER canónica KDEL (SEQ ID NO: 16) (Seetharam S et al., *J Biol Chem.*, 266(26): 17376-81 (1991), Du X, Ho M, y Pastan I, *J Immunother.*, 30(6): 607-13 (2007), Rozemuller H. et al., *Int J Cancer.*, 92(6): 861-70 (2001), Kreitman RJ y Pastan I., *Biochem J.*, 307 (Pt 1): 29-37 (1995)). Se sabe que este cambio aumenta la citotoxicidad de la PE, presumiblemente mejorando la eficiencia del transporte retrógrado al ER desde el Golgi. Esta estrategia es eficaz, pero habitualmente también aumenta la toxicidad no específica de la RIT. Otra estrategia consiste en aumentar la internalización productiva del complejo RIT-receptor y aumentar, de esta manera, la cantidad de toxina en la célula, mejorando la afinidad entre el Fv y su blanco (Salvatore G et al., *Chn Cancer Res.*, 8(4): 995-1002 (2002), Decker T et al., *Blood.*, 103(7): 2718-26 (2004)).

Más recientemente, se ha diseñado una RIT resistente a la proteasa para soportar la degradación en el sistema endolisosomal, un posible obstáculo para el tratamiento eficaz con inmunotoxina (Johannes L y Decaudin D, *Gene Ther.*, 12(18): 1360-8 (2005), Fitzgerald D. *Why toxins Semin Cancer Biol.*, 7(2): 87-95 (1996)). Se

produjo esta variante de RIT “resistente a la degradación lisosomal” (LR) sacando regiones sensibles a la proteasa de la PE3, y dirigiéndola al receptor CD22 de células B con un Fv anti-CD22 de alta afinidad derivado de la RIT HA22 (Weldon JE, *Blood.*, 113(16): 3792-800 (2009)). La mutación LR no afectó seriamente la actividad *in vitro* en las líneas celulares, pero redujo grandemente la toxicidad no específica en ratones y aumentó en forma considerable la actividad *in vitro* en células de la leucemia linfocítica crónica (CLL) derivadas de pacientes. Adicionalmente, la variante LR elimina dos grupos principales de epítomos de células B de ratón (Onda M et al., *J Immunol*, 177(12): 8822-34 (2006)) y sitios de procesamiento de antígeno de la PE38, ayudando a reducir su inmunogenicidad en ratones (Hansen JK et al., *J Immunother.* , 33(3): 297-304 (2010)). Debido a la naturaleza modular de las RIT, se puede dirigir la variante LR de la PE a otros antígenos asociados a tumores intercambiando un Fv por otro. Por consiguiente, la técnica que divulga la reducción en el Dominio II e Ib de la PE enseña en general sobre las ventajas que produce retirar los sitios sensibles a la proteasa y antigénicos de la molécula. Asimismo, esta técnica en general presenta las ventajas farmacocinéticas de las RIT más pequeñas, lo cual es el resultado de estos cambios.

Un candidato objetivo clínicamente importante es el antígeno mesotelina asociado a tumores, que a menudo se ve altamente expresado en cánceres que incluyen mesoteliomas y cánceres al pulmón, ovarios y páncreas. Por lo tanto, existe la necesidad de RIT mejoradas que se puedan dirigir específicamente a células cancerosas que expresan mesotelina en sus superficies. La presente invención suple estas y otras necesidades proporcionando RIT, composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento para cánceres que expresan o sobreexpresan mesotelina .

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* (“PE”) mejorada con una inmunogenicidad reducida, una resistencia mejorada a las proteasas lisosomales, y citotoxicidad mejorada para células que expresan mesotelina. Estructuralmente, a la PE mejorada de la invención se le ha retirado un Dominio I de PE, se ha retirado la mayor parte del Dominio II de la PE, y un Dominio funcional III de

PEI, opcionalmente, con sustituciones a) en las posiciones D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y/o Q592 de los residuos de aminoácidos del Dominio III de la PE, por una glicina, alanina o serina y/o b) en las posiciones D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y/o L597 de los residuos de aminoácidos del Dominio III de la PE, por glicina, serina o alanina. El mejoramiento consiste en la inserción de un linker peptídico corto y flexible ("FL") de 3 a 8 aminoácidos de longitud y consistente en residuos de glicina y/o serina en secuencia entre el sitio de corte de furina y el Dominio funcional III de la PE mejorada. Por consiguiente, el linker corto está compuesto por residuos de glicina y/o serina. En algunas modalidades, el linker es un péptido de la fórmula: $(Xaa1)_n$ donde cada Xaa1 es seleccionado en forma independiente de glicina y serina y n es de 3 a 8. Las moléculas de PE mejorada de la invención retienen la alta actividad citotóxica con la remoción de epítopos de células B. En forma sorprendente, la inclusión del linker flexible corto mejora la citotoxicidad de la molécula sin alterar en forma sustancial el corte de la molécula por la furina. Las moléculas de PE mejoradas son ejemplificadas por modalidades determinadas de la invención denominadas aquí como (LR/FL/8X, SEQ ID NO: 4) y LR/FL/8M (SEQ ID NO: 5). Además, hay modalidades donde las moléculas de PE tienen una o más mutaciones en su dominio funcional III en la SEQ ID NO: 4 o 5 en comparación con el dominio funcional de la PE de la SEQ ID NO: 1. En otras modalidades, hay contempladas sustituciones adicionales en uno o más residuos correspondiendo a las posiciones 609-613 de la SEQ ID NO: 1 que también tienen una función de retención del retículo endoplasmático de la secuencia nativa. En otras modalidades más, el sitio de corte por furina del Dominio II de la PE está modificado o sustituido por otro sitio de corte de furina.

En algunas modalidades más compatibles con cualquiera de las antes mencionadas, la PE comprende un dominio funcional III que tiene una o más mutaciones con respecto al dominio funcional de una toxina PE de la SEQ ID NO: 2 (posiciones 12 a 230) o seleccionadas de la siguiente tabla que remueven uno o más epítopos del Dominio III de la PE:

Tabla 2

Epítopo removido	Mutaciones
2	R467A
4	R432G, D406A
5	R490A
6	E548A, R513A
7	K590S, Q529A

* Se describen los epítopos, por ejemplo, en Onda, et al, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 105(32): 1131 1- 6 y en WO 2007/016150.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona RIT (“los RIT de la invención”) que son moléculas quiméricas que comprenden (a) una parte o porción dirigida a la mesotelina, conjugada o fusionada con (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* modificada (“PE”) según se ha indicado anteriormente. En algunas modalidades, la parte es un anticuerpo seleccionado del grupo compuesto por un scFv, un dsFv, un Fab, un anticuerpo de un solo dominio y un F(ab’)₂ o un polipéptido que comprende las CDR del anticuerpo. SS1 y MORab-009 son porciones dirigidas preferidas. Además, el anticuerpo anti-mesotelina puede comprender una región variable de cadena pesada (“V_H”) y una región variable de cadena ligera (“V_L”), donde las cadenas V_H y V_L tienen cada una una primera, una segunda y una tercera región determinante de la complementariedad (“CDR”), donde la primera CDR (“CDR1”), la segunda CDR (“CDR2”) y la tercera CDR (“CDR3”), respectivamente, de dicha cadena pesada tienen la secuencia de residuos de aminoácidos mostrada para CDR1 (GYTMN; SEQ ID NO: 51), CDR2 (LITPYNGASSYNQKFRG; SEQ ID NO: 52), y CDR3 (GGYDGRGFDY; SEQ ID NO: 53), y donde las CDR 1, 2 y 3 respectivamente, de dicha cadena V_L tienen la secuencia de residuos de aminoácidos mostrada para CDR1 (SASSSVSYMH; SEQ ID NO: 54), CDR2 (DTSKLAS; SEQ ID NO: 55), y CDR3 (QQWSGYPLT; SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, la CDR3 de la cadena ligera está modificada y tiene la secuencia QQWSKHPLT (SEQ ID NO: 57), QQWSGHPLT (SEQ ID NO: 58), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 59), QQWSQIPLT (SEQ ID NO: 60), QQWGFNPLT (SEQ ID NO: 61), QQWGTNPLT (SEQ ID NO: 62), QQWGSHPPLT (SEQ ID NO: 63), QQWGDFPLT (SEQ ID NO: 64), QQWGDHPLT (SEQ ID NO: 65),

QQWSAHPLT (SEQ ID NO:66), o QQWSGYPTT (SEQ ID NO: 67). En algunas otras modalidades, el anticuerpo anti-mesotelina es un scFv, un dsFv, un Fab o un F(ab')₂. En algunas otras modalidades, el anticuerpo anti-mesotelina que se ha de usar en la RIT comprende una sustitución de aminoácido de por lo menos un aminoácido en una CDR seleccionada del grupo compuesto por CDR1 de la V_L, CDR2 de la V_L, CDR1 de la V_H y CDR2 de la V_H, estando dicho aminoácido codificado por un codón que comprende un nucleótido que pertenece a un motivo de gran actividad ("hotspot") seleccionado de AGY o RGYW, donde R es A o G, Y es C o T y W es A o T.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden

(a) RIT de la invención según se indicó anteriormente y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un FL de exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") modificada o una RIT descrita anteriormente. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica también la totalidad o un fragmento (una cadena ligera o pesada variable o CDR) del anticuerpo dirigido a mesotelina.

En consecuencia, en un primer grupo de modalidades, la invención proporciona exotoxinas A de *Pseudomonas* ("PE"s) modificadas aisladas, que comprenden una secuencia de polipéptido continua de la siguiente fórmula: dominio funcional III de FCS-FL-PE o dominio funcional III de L1-FCS-FL-PE, donde L1 está compuesto por una secuencia de péptido continua de 1 a 10 residuos de aminoácidos de longitud; FCS representa la secuencia o sitio de corte de furina (por ejemplo, RHRQPRGWEQL; SEQ ID NO: 17), u otra secuencia que pueda ser cortada por furina; y FL representa una secuencia peptídica linker flexible compuesta por 3 a 8 residuos de aminoácidos seleccionados en forma independiente de glicina y serina; y el dominio funcional III de la PE comprende los residuos 395-613 de la SEQ ID NO: 1, que comprende en forma opcional (i) sustituciones en uno o más residuos que corresponden a 609-613 de la SEQ ID NO: 1, (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de la SEQ ID NO: 1, (iii) una

sustitución de uno o más residuos correspondientes a los residuos de la SEQ ID NO: 1, residuos de la SEQ ID NO: 1 que mantienen la inmunogenicidad de un epítipo o subepítipo del dominio III de la PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i) - (iii). En modalidades preferidas, el dominio funcional de la PE es el dominio funcional de PE de LR/FL/8X (SEQ ID NO: 4) o de LR/GGS/8M (SEQ ID NO: 3).

En otro grupo de modalidades, la invención proporciona moléculas quiméricas o RIT que comprenden (a) un ligando o mitad dirigida, donde este ligando se une específicamente a la mesotelina en una superficie celular, conjugado o fusionado con (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* modificada ("PE") según se indicó anteriormente. En algunas modalidades, el ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo que retiene la capacidad de reconocimiento del antígeno. En modalidades preferidas, los anticuerpos son derivados de un anticuerpo parental SS1. De preferencia, la RIT es SS1-LR/GGS/8X que tiene un FL GGS insertado entre el FCS y el dominio funcional III. Por lo tanto, estas RIT pueden comprender una cadena ligera variable SS1 de la SEQ ID NO: 6 y una secuencia de inmunotoxina recombinante de cadena pesada variable de SS1 de la SEQ ID NO: 8 o de la SEQ ID NO: 9 donde las cadenas ligeras y pesadas variables de SS1 forman un anticuerpo estabilizado por disulfuro.

En otro grupo más de modalidades, la invención proporciona métodos terapéuticos para eliminar células blanco o inhibir el crecimiento de células blanco que expresan o sobreexpresan mesotelina en el exterior de las células. Los métodos comprenden poner en contacto las células con las RIT de la invención. La mesotelina es un antígeno de diferenciación que está presente en la superficie de cánceres ováricos, mesoteliomas y algunos otros tipos de cánceres humanos. Se pueden usar las RIT de la invención, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo* para eliminar o inhibir el crecimiento de cánceres de ovario, de estómago, de células escamosas, mesoteliomas y otras células malignas que expresan la mesotelina. Se contemplan métodos para tratar a los pacientes que tienen estas condiciones y tienen necesidad de dicho tratamiento con las RIT de la invención.

En otro grupo más de modalidades, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican las PE mutadas y las RIT descritas anteriormente.

En algunas modalidades de cualquiera de las anteriores, el linker flexible es GGS o GGSGGS (SEQ ID NO: 18).

En otras modalidades más, el anticuerpo es seleccionado del grupo compuesto por un scFv, un dsFv, un Fab, un anticuerpo de un solo dominio y un $F(ab')_2$. En algunas otras modalidades de lo anterior, el anticuerpo es SS1 o un SS1 creado mediante ingeniería (un svFc, un dsFv, un Fab, un anticuerpo de un solo dominio, o un $F(ab')_2$ del anticuerpo SS1, o fragmento(s) que proporcionan las porciones de CDR del anticuerpo SS1). En algunas modalidades, se usan las CDR del anticuerpo como la porción dirigida. En algunas modalidades, el anticuerpo es humano o humanizado. En algunas modalidades, la PE modificada es LR/GGS/8M (SEQ ID NO: 3) o $LR/(Xaal)_n/8X$ (SEQ ID NO: 4) o $LR/(Xaal)_n/8M$ (SEQ ID NO: 5). En algunas otras modalidades, la molécula quimérica es SS1-LR/GGS/8X (SEQ ID NOS: 6 y 7) o SS1-LR/GGS/8M (SEQ ID NOS: 6 y 8) donde sus respectivas porciones dirigidas comprenden las porciones V_L y V_H del anticuerpo SS1.

Otras modalidades serán evidentes para los que tienen un conocimiento común y corriente en la materia, las cuales se describen en la presente.

Por lo tanto, en algunas modalidades, la invención proporciona una molécula quimérica que comprende un fragmento de anticuerpo anti-mesotelina directamente unido en secuencia a un primer linker peptídico de 3 a 8 aminoácidos de longitud que está directamente unido en secuencia al sitio de corte del polipéptido furina RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 17) que está directamente unido en secuencia a un segundo linker peptídico compuesto por 3 a 6 aminoácidos seleccionados de Gly y Ser y que está directamente unido en secuencia al aminoácido N-terminal de un Dominio funcional III de la exotoxina A de Pseudomonas. En algunas otras modalidades, el dominio funcional es el Dominio III de LR o LR/8M y el fragmento del anticuerpo es el dsFv de SS1-LR. En algunas modalidades, donde el primer linker peptídico (L1) está directamente unido en secuencia al extremo carboxi terminal de la porción V_H del dsFv. Asimismo, se proporcionan composiciones farmacéuticas de las moléculas quiméricas como también su uso en un método para tratar un cáncer que sobreexpresa mesotelina en un sujeto que lo requiere. En otras modalidades, el cáncer

es un adenocarcinoma pulmonar, un carcinoma ovárico, un mesotelioma, o un carcinoma epidermoide.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Inmunotoxinas recombinantes. (A) La inmunotoxina recombinante SS1P está compuesta por las cadenas polipeptídicas pesadas (VH) y ligeras (VL) estabilizadas por disulfuro (ds) del fragmento variable (Fv) del anticuerpo monoclonal anti-mesotelina SS1 acoplado a un fragmento de 38 kDa de exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38) a través de un linker peptídico corto (ASGG; SEQ ID NO: 19) de la cadena pesada. La PE38 está compuesta por el dominio II, el dominio III, y un fragmento del dominio Ib de la exotoxina A de *Pseudomonas* nativa. El Dominio II incluye un bucle expuesto a solvente, unido por cisteínas que forman un enlace disulfuro, que contiene un sitio de corte por la proteasa furina (RHRQPRGWEQL; SEQ ID NO: 17). (B) La variante de SS1P, SS1-LR, resistente a la degradación lisosomal, carece del dominio Ib y del dominio II de la PE, salvo por un tramo de 11 residuos que contiene el sitio de corte por furina del dominio II. Se crearon diversas construcciones con mutaciones (subrayadas) alrededor del sitio de corte de furina de SS1-LR (SEQ ID NOS: 20-24).

Figura 2. Citotoxicidad de SS1-LR en líneas celulares positivas para mesotelina. Se incubaron las líneas celulares L55, NCI-H322M, HAY, KB31, M30, A431/K5, OVCAR-8, y A1847 con concentraciones cada vez mayores de SS1P (círculos sin relleno, línea sólida) o SS1-LR (cuadrados sin relleno, línea discontinua). Después de 3 días, se evaluó la viabilidad celular con un ensayo colorimétrico con WST-8, y se estandarizó entre controles no tratados y tratados con ciclohexamida. Se grafican los valores medios y errores estándares de seis replicados. El SS1-LR comprende la cadena polipeptídica de V_L de SS1 estabilizada con disulfuro de la SEQ ID NO: 6 y la cadena polipeptídica de V_H-PE de SS1 de la SEQ ID NO: 74.

Figura 3. Las dosis altas de SS1-LR tienen una potente actividad antitumoral. Ratones sin pelaje (nude) con xenoinjerto de tumores A431/K5 fueron sometidos a tratamiento intravenoso los días 5, 7 y 9 después del implante con tampón RIT (HSA 0,2% en PBS; cruces, línea sólida), 0,3 mg/kg de SS1P (círculos sin relleno, línea

sólida), o SS1-LR en dosis de 6 (cuadrados sin relleno, línea discontinua) o 15 (cuadrados rellenos, línea discontinua) mg/kg. Las flechas indican los días en que se administró el tratamiento. Se midió el tamaño de los tumores durante el curso de 22 días. Los puntos representan el tamaño tumoral medio de todos los ratones en el grupo de tratamiento ($n = 6$). Las barras de error indican el error estándar de cada valor medio.

Figura 4. Procesamiento con inmunotoxina internalizada. Se incubaron células A431/K5 en forma continua con (A) SS1P o (B) SS1-LR, se lisaron en varios puntos de tiempo de 0 a 24 horas, y se analizaron mediante inmunotransferencia SDS-PAGE ("Western blot") no reductora con un anticuerpo anti-PE. Se indican bandas de longitud completa, reducidas y cortadas por furina. (C) La intensidad de la banda cortada por furina en relación con la intensidad total de todas las bandas en cada punto temporal se muestra para SS1P (círculos sin relleno, línea sólida) y SS1-LR (cuadrados sin relleno, línea discontinua).

Figura 5. La adición de un linker flexible aumenta la citotoxicidad de SS1-LR. Se incubaron las líneas celulares (A)KB31 y (8)NCI-H322M con concentraciones cada vez mayores de SS1P (círculos sin relleno, línea sólida), SS1-LR (cuadrados sin relleno, línea discontinua), SS1-LR/GGS (diamantes sin relleno, línea sólida), o SS1-LR/GGS R279G (hexágonos rellenos, no hay línea). Después de 3 días, se evaluó la viabilidad celular con un ensayo WST-8 colorimétrico, y se estandarizó entre controles no tratados y tratados con ciclohexamida. Se grafican los valores medios y los errores estándares de seis replicados.

Figura 6. Citotoxicidad del SS1-LR/GGS/8M en células de pacientes. Se colocaron células cultivadas del líquido pleural o ascitis de pacientes con mesotelioma con concentraciones cada vez mayores de SS1P (barra blanca) o SS1-LR/GGS/8M (barra gris) de RIT. Después de 4 días, se fijaron las células y se tiñeron con cristal violeta para detectar las células intactas. Se estandarizó la absorbancia resultante a 595 nm en comparación con un control no tratado. Se grafican los valores medios y errores estándares de seis replicados. Sin asterisco = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Figura 7. Comportamiento *in vivo* de SS1-LR/GGS/8M. A) Actividad antitumoral del SS1-LR/GGS/8M. Ratones sin pelaje (nude) con tumores de xenoinjerto L5K5 fueron sometidos a tratamiento intravenoso los días 7, 9 y 12 después del implante con tampón RIT (HSA 0,2% en D-PBS; cruces, línea sólida), 0,4 mg/kg de SS1P (círculos sin relleno, línea sólida), o SS1-LR/GGS/8M en dosis de 0,4 (cuadrados sin relleno, línea discontinua) o 2,5 (cuadrados rellenos, línea discontinua) mg/kg. Las flechas indican los días en que se administró el tratamiento. Se midió el tamaño tumoral durante el curso de 30 días. Los puntos representan el tamaño tumoral promedio de todos los ratones en el grupo de tratamiento ($n = 7$). Las barras de error indican el error estándar de cada valor medio. B) Modelo de síndrome de extravasación capilar en rata. Las ratas fueron sometidas a tratamiento intravenoso con PBS, SS1P o SS1-LR/GGS/8M, observadas después de 24 horas, y posteriormente sacrificadas. Se recogió el líquido torácico de los animales sacrificados y se midió. Se fijaron los pulmones de varias ratas, se seccionaron y tiñeron con hematoxilina y eosina. C) Se presentan fotografías representativas a una ampliación de 200X. D) Farmacocinética del SS1-LR/GGS/8M. Ratones BalbC fueron inyectados por vía intravenosa con 10 μ g de ya sea SS1P o bien SS1-LR/GGS/8M y se desangraron en varios intervalos entre 2 y 60 minutos desde el momento de aplicación de la inyección. La concentración de inmunotoxina en el suero en los diversos intervalos fue determinada mediante ELISA y ajustada a una función de decaimiento exponencial. Se indica la vida media ($t_{1/2}$) correspondiente. Cada punto es la concentración de inmunotoxina en el suero de un ratón, y se determinó la concentración en cada intervalo de tiempo a partir de por lo menos dos ratones diferentes.

Figura 8. Antigenicidad humana del SS1-LT/GGS/8M. Se comparó la reactividad del SS1P y SS1-LR/GGS/8M con anticuerpos preexistentes en los sueros humanos usando un ensayo de desplazamiento para determinar la concentración a la cual las dos RIT redujeron la señal de un ELISA para detectar anticuerpos séricos en un 50% (IC₅₀). Se grafican aquí los valores IC₅₀ relativos de SS1P a SS1-LR/GGS/8M. La antigenicidad del SS1-LR/GGS/8M se reduce en forma considerable en relación con el SS1P para todos los sueros.

Figura 9. Resumen de citotoxicidad del SS1-LR/GGS/8M en las células de pacientes. Viabilidad relativa comparada con tratamiento. Se colocaron células cultivadas del líquido pleural o ascitis de pacientes con mesotelioma en placas con concentraciones cada vez mayores de SS1P (barra blanca) o SS1-LR/GGS/8M (barra gris). Después de 4 días, se fijaron las células y se tiñeron con cristal violeta para detectar las células intactas. Se estandarizó la absorbancia resultante a 595 nm en comparación con un control no tratado. Se grafican los valores medios y errores estándares de seis replicados. Los asteriscos indican diferencias importantes de $p < 0,01$ (**), o $p < 0,001$ (***).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una variante menos tóxica y menos inmunogénica de las RIT anti-mesotelina en base a SS1P de RIT anti-mesotelina basada en PE. Nuestra evaluación inicial del SS1-LR, generada en base al trabajo previo con la RIT anti-CD22 HA22-LR en base a PE (Weldon et al., Blood 113(6): 3792-3800)(2009)), mostró una actividad sumamente variable *in vitro* en una selección de líneas celulares que expresan mesotelina. En un ensayo de xenoinjerto de tumor A431/K5 de ratón, el SS1-LR (SEQ ID NOS: 6 y 7) fue menos activo que el SS1P, pero se pudo administrar el SS1-LR en dosis mucho más altas para alcanzar una regresión tumoral importante. Mientras se exploraban las razones para su actividad sumamente variable en relación con el SS1P, se estudió la internalización y el procesamiento del SS1-LR y se descubrió que la proporción de SS1-LR cortado por furina fue mucho más baja que la de SS1P. Esto indicó que la disminución del corte por furina podría estar limitando la actividad de SS1-LR, y se diseñó y produjo varios mutantes para probar esta hipótesis. La adición de un linker Gly-Gly-Ser corto después del sitio de corte de furina aumentó la actividad del SS1-LR en las líneas celulares, pero sorprendentemente la citotoxicidad aumentada no correspondió a un aumento en el corte por furina. La presente invención está relacionada con este descubrimiento sorprendente de la importancia de un linker flexible corto para la citotoxicidad de un constructo de RIT anti-mesotelina en forma independiente de cualquier efecto en el corte de la PE por furina. En otro trabajo, se incorporaron 8 mutaciones puntuales que se ha mostrado reducen

la inmunogenicidad de la PE en el SS1-LR/GGS y luego se sometió a prueba la molécula en células malignas primarias de pacientes con mesotelioma. La molécula final, SS1-LR/GGS/8M (SEQ ID NOS: 6 y 8), demostró una citotoxicidad similar al SS1P. Además, las RIT de acuerdo a la invención pueden proporcionar una toxicidad no específica marcadamente reducida (por ejemplo, síndrome de extravasación capilar) en los mamíferos.

Se observó una diferencia de aproximadamente 20 veces en el efecto antitumoral entre el SS1-LR y el SS1P usando un modelo de tumor de xenoinjerto A4311K5 en ratón *in vivo*. No se puede atribuir esta diferencia enteramente a la citotoxicidad, porque los datos de citotoxicidad *in vitro* indican una disminución de 4 veces de la citotoxicidad en las células A4311/K5. En cambio, es probable que el resto de esta diferencia se deba a las propiedades farmacocinéticas del SS1-LR en los ratones. Hemos mostrado previamente que la HA22-LR tiene una vida media sérica casi 2 veces más corta en ratones que la HA22 (7,8 comparado con 14,6 minutos, respectivamente), y se ha postulado que la diferencia se debió a un aumento de la filtración renal de la molécula LR más pequeña (Weldon JE, *Blood.*, 113(16): 3792-800 (2009)). Al examinar el área bajo la curva de decaimiento, esta diferencia en la vida media indica una diferencia de 4 veces en la proteína disponible durante el curso de una hora. Por lo tanto, se puede atribuir la diferencia en la actividad *in vivo* a tanto la disminución de la citotoxicidad como a una vida media más corta.

Si bien el SS1-LR demostró una actividad antitumoral menor que el SSP1 *in vivo*, su toxicidad no específica se vio también reducida en gran manera en los ratones. Aprovechamos esta propiedad para aumentar en forma considerable la dosis de SS1-LR por sobre el SS1P (50 veces) en el ensayo con tumores de xenoinjerto, causando un aumento sustancial en el efecto antitumoral. Experimentos previos han mostrado en forma diversa que la LD50 intravenosa de una dosis única de SS1P es 1,0 mg/kg en ratones Balb/C (Filpula D et al., *Bioconjug Chem.*, 18(3): 773-84 (2007)) y 0,75 mg/kg en ratones suizos NIH (Onda M et al., *Cancer Res.*, 61(13): 5070-7 (2001)). Usando un programa de dosificación QODx3 similar al programa clínico, los ratones han tolerado una dosis máxima de 0,3 mg/kg de SS1P (observaciones no publicadas). Sin embargo,

se administró el SS1-LR QODx3 en el experimento antitumor de xenoinjerto A431/K5 en una dosis de 15 mg/kg sin efecto negativo. Previamente, una dosis intravenosa única de HA22-LR de 20 mg/kg no mostró toxicidad para los ratones (Weldon JE, *Blood.*, 113(16): 3792-800 (2009)), y hemos administrado dosis únicas de HA22-LR de hasta 45 mg/kg a ratones sin causar la muerte (observaciones no publicadas). Si bien no se ha sometido a pruebas clínicas la molécula LR, este efecto indica que las variantes de RIT LR pueden tener una toxicidad disminuida en los pacientes humanos, lo que podría evitar las toxicidades limitantes de la dosis y permitir la administración de dosis más altas.

Si bien el SS1-LR fue eficaz *in vitro* e *in vivo*, estábamos preocupados por la actividad generalmente disminuida en relación con el SS1P. Una posible explicación para esta disparidad es una diferencia en la vía de intoxicación intracelular. La variante LR de PE38 contiene deleciones extensas en el dominio II y Ib de la PE, y estas deleciones podrían haber afectado de manera negativa la capacidad de la PE para transferirse al citosol. Y lo que es más interesante, nuestros experimentos iniciales para detectar PE de longitud completa y procesada en lisados de células tratadas con SS1P y SS1-LR mostraron una diferencia importante en la cantidad de RIT procesada/cortada por furina. Se procesó una fracción grande de la RIT total en las células tratadas con SS1P, pero solo una pequeña fracción de la RIT total en las células tratadas con SS1-LR. Este resultado indicó que el corte deficiente de furina podría estar limitando la actividad del SS1-LR, y nos propusimos mejorar esta etapa de la vía de intoxicación de la PE.

Nuestros esfuerzos por aumentar la citotoxicidad del SS1-LR aumentando la accesibilidad del sitio de corte de furina produjeron una RIT más activa, pero no pudimos demostrar un aumento del corte por furina. La adición de un linker Gly-Gly-Ser corto (SS1-LR/GGS, Figura 1B), un linker más largo (SS1-LR/GGSx2, Figura 1B), o una repetición del sitio de furina flanqueado por linkers Gly-Gy-Ser cortos (SS1-LR/2xFurina, Figura 1B) otorgaron todos un aumento modesto de la citotoxicidad. No obstante, ninguna de estas moléculas aumentó la proporción de SS1-LR cortado por furina en células A431/K5 tratadas ni aumentó la velocidad del corte por furina *in vitro*.

Concluimos que la adición de un linker debe aumentar la citotoxicidad a través de otro mecanismo, tal vez relacionado con el tráfico intracelular de la molécula en las células tratadas.

Asimismo, estos experimentos demostraron la absoluta necesidad de un corte por furina para retener la citotoxicidad del SS1P. Una mutación puntual en el SS1-LR/GGS que cambió una arginina esencial para el corte a glicina (SS1-LR/GGS R279G, Figura 1B) produjo una proteína que no fue cortada por la furina. Esta RIT no mostró actividad en las células NCI-H322M y KB31. La necesidad de un corte por furina en la vía de intoxicación de la PE ha sido recientemente cuestionada (Morlon-Guyot J et al., *Infect Immun.*, 77(7): 3090-9 (2009)), pero existe mucha evidencia de que la furina desempeña un papel importante durante la intoxicación (Ornatowski W et al., *J Clin Invest.*, 117(11): 3489-97 (2007), Shiryayev SA et al., *J Biol Chem.*, 282(29): 20847-53 (2007), Sarac MS et al., *Infect Immun.*, 70(12): 7136-9 (2002), Chiron MF, Fryling CM, y FitzGerald D, *J Biol Chem.*, 272(50): 31707-11 (1997), Gu M et al., *Infect Immun.*, 64(2): 524-7 (1996), Inocencio NM, Moehring JM, y Moehring TJ, *J Biol Chem.*, 269(50): 31831-5 (1994), Moehring JM et al., *J Biol Chem.*, 268(4): 2590-4 (1993)). En el caso presentado aquí, la intoxicación de la PE falla sin contener un sitio adecuado para el procesamiento de furina. Está en curso una investigación para explorar la relación entre el corte por furina y la citotoxicidad.

Una línea separada de investigación en nuestro laboratorio ha producido recientemente una variante de la HA22, HA22-LR-8M, que tiene una inmunogenicidad extremadamente baja debido a la eliminación de epítopos de células B (Onda M et al., Presentado para ser publicado a *PNAS*.). La HA22-LR-8M contiene las mismas deleciones que la variante LR de la PE, pero incorpora también ocho mutaciones puntuales en el dominio''' de la PE. Se colocaron estas mutaciones en el SS1P para generar SS1-LT/GGS/8M. Las únicas diferencias entre la HA22-LR-8M y el SS1-LR/GGS/8M son el anticuerpo Fv y el linker GGS después del sitio de corte de furina. Dado que la gran parte de la respuesta inmunológica a las RIT está dirigida en PE, el SS1-LR/GGS/8M debiera exhibir una inmunogenicidad similarmente reducida.

Se comparó la citotoxicidad del SS1-LR/GGS/8M con el SS1P en células malignas primarias de pacientes con mesotelioma, y los resultados mostraron que el SS1-LR/GGS/8M tenía una citotoxicidad comparable con o mejor que el SS1P. Además de la buena actividad, el SS1-LR/GGS/8M tiene ventajas potenciales por sobre el SS1P que incluyen una toxicidad no específica disminuida y una baja inmunogenicidad. Los experimentos descritos en la presente indican que el SS1-LT/GGS/8M sería un excelente candidato para el uso clínico debido a su baja inmunogenicidad, baja toxicidad no específica y buena citotoxicidad.

Definiciones

Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada por el *Système International de Unites* (SI) (Sistema Internacional de Unidades). Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. A menos que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi. Los encabezados provistos en la presente no son limitaciones de los diversos aspectos o modalidades de la invención, que se pueden tener por referencia a la especificación en su conjunto. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación son definidos en forma más completa por referencia a la especificación en su totalidad.

La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") nativa es una proteína monomérica extremadamente activa (66 kD de peso molecular), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucarióticas. La secuencia de PE nativa es indicada en la SEQ ID NO: 1 de la Patente US 5.602.095, incorporada en la presente por referencia. El método de acción es la inactivación del factor de elongación 2 (EF-2) mediante ADP-ribosilación. La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan de manera concertada para causar citotoxicidad. El dominio I (aminoácidos 1-252) media la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación al citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media la ADP ribosilación del factor de elongación 2. La estructura original de la PE clasifica el dominio III como los residuos 405-613, no los residuos 400-613. Allured VS, Collier RJ,

Carroll SF & McKay DB, *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 1320-1324 (1986). La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) sigue siendo indefinida, si bien se puede eliminar (delecionar) sin pérdida de citotoxicidad, una gran parte de ello, los aminoácidos 365-380. Ver Siegall, *et al.*, *J Biol Chem* 264:14256-61 (1989). Numerosas de estas modificaciones son conocidas en la técnica e incluyen, pero no están limitadas a, eliminación del dominio Ia, diversas eliminaciones (deleciones) de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de un solo aminoácido y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo terminal como por ejemplo, KDEL (SEQ ID NO: 16) y REDL (SEQ ID NO: 26). Ver Siegall, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **264**:14256-14261 (1989). Las inmunotoxinas de la presente invención son capaces de la translocación y EF-2 ribosilación en una célula blanco.

Las mutaciones de la PE son descritas en la presente por referencia al residuo de aminoácido presente en una posición determinada de la secuencia de 613 aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO: 1), seguida del aminoácido con el cual ese residuo ha sido reemplazado en la mutación determinada en discusión. En consecuencia, por ejemplo, el término “R490A” indica que la “R” (arginina, en un código de una sola letra estándar) en la posición 490 de la molécula mencionada es reemplazada por una “A” (alanina, en un código de una sola letra estándar), en tanto que K590Q” indica que la lisina normalmente presente en la posición 590 ha sido reemplazada con una glutamina. El código de una sola letra estándar para los aminoácidos comunes se muestra a continuación.

El término “dominio funcional III de la PE” o “Dominio III funcional de la PE” se refiere a los residuos 395-613 de la PE nativa (la secuencia nativa es SEQ ID NO: 1). Si bien se ha fijado los límites estructurales del dominio III en los residuos 405-613, los análisis funcionales han mostrado que el dominio III requiere un segmento del dominio Ib para retener la actividad de ADP-ribosilación (Hwang, J. *et al.*, *Cell*, 48:129-136 (1987), Siegall, C.B. *et al.*, *J Biol Chem*, 264:14256-14261 (1989)). Por consiguiente, el dominio funcional III de la PE es definido por los residuos 395-613 de la PE (Kihara, A. y Pastan, I., *Bioconjug Chem*, 5:532-538 (1994)). En la presente, la secuencia del Dominio funcional III de la PE incluye las modificaciones opcionales para reducir la

antigenicidad y las secuencias alternativas opcionales de retención del retículo endoplasmático.

Se pueden variar los residuos terminales del Dominio III de PE, REDLK (SEQ ID NO: 15) en formas que aumentarían la citotoxicidad de las RIT resultantes de acuerdo a la presente invención. Por ejemplo, las inmunotoxinas hechas con PEs mutadas que terminan en las secuencias KDEL (SEQ ID NO: 16), REEL (SEQ ID NO: 27) o RDEL (SEQ ID NO: 28) pueden ser mucho más citotóxicas para las células blanco que las inmunotoxinas hechas con PE38 que lleva la secuencia terminal nativa. Ver, Kreitman y Pastan, *Biochem J*, 307(Pt 1): 29-37 (1995). Se pueden usar también repeticiones de estas secuencias en las actuales RIT. Ver, por ejemplo, las Patentes de US 5.854.044, US 5.821.238 y US 5.602.095 y la publicación de solicitud Internacional WO 99/51643. Si bien las PE que terminan en KDEL (SEQ ID NO: 16) son útiles para propósitos *in vitro*, éstas pueden tener una mayor toxicidad no específica en animales y ser menos preferidas para el uso *in vivo*.

El término “mesotelina” se refiere a una proteína y fragmentos de la misma presentes en la superficie de algunas células humanas y unidas por, por ejemplo, el anticuerpo K1. El ácido nucleico y las secuencias de aminoácido de mesotelina se indican, por ejemplo, en la solicitud publicada PCT WO 97/25.068 y las patentes US 6.083.502 y N° 6.153.430. Ver también Chang, K. & Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57: 90 (1994), Chang, K. & Pastan, I., *Proc. Nat’l Acad. Sci. EE. UU.* **93**: 136 (1996), Brinkmann U., *et al.*, *Int. J. Cancer* **71**: 638 (1997), Chowdhury, P.S., *et al.*, *Mol. Immunol.* **34**: 9 (1997), y la patente US 6.809.184. La mesotelina es expresada como una proteína precursora de aproximadamente 69 kDa, que es luego procesada para liberar una proteína de 30 kDa si bien deja adjunta a la superficie celular la glicoproteína de superficie celular unida al glicosilfosfatidilinositol de 40 kDa descrita en los Antecedentes. La glicoproteína de 40 kDa es denominada con el término “mesotelina” en la presente. Se han registrado las secuencias de aminoácido y ácido nucleico de la mesotelina de varias especies, por ejemplo, NM_005823.4→NP_005814.2 de humano; y NM_013404.3→NP_037536.2),

(NM_018857.1→NP_061345.1) de ratón, (NM_031658.1→NP_113846.1) de rata, (NM_001100374.1→NP_001093844) de vacuno.

A fin de facilitar la referencia, según se usa en la presente, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos completos (a veces denominados en la presente como “íntactos”), fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de reconocimiento de antígenos y de unión, ya sea producidos mediante la modificación de los anticuerpos completos o bien sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales e imitadores de anticuerpos, a menos que el contexto requiera algo diferente. El anticuerpo puede ser una IgM, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgD, IgA o IgE.

Las secuencias de las regiones constantes de las subclases de IgG han sido muy conocidas en la técnica por años (por ejemplo, Honjo et al., *Cell*, 18: 559-68 (1979), Tucker et al., *Science*, 206: 1303-6 (1979), Yamawaki et al., *Nature* 283: 786-9 (1980), Ellison et al., *Nucl Acids Res* 10: 4071-9 (1982), Ellison et al., *DNA* 1: 11-8 (1981), Ellison y Hood, *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 1984-8 (1982)). Puesto que las CDR de las regiones variables determinan la especificidad del anticuerpo, las CDR o los Fv de anticuerpos contra un antígeno de superficie de célula blanco pueden ser injertados o creados mediante ingeniería genética en un anticuerpo escogido para conferir especificidad para el antígeno de superficie celular diana en ese anticuerpo. Por ejemplo, las CDR de un anticuerpo contra un antígeno de superficie de célula blanco pueden ser injertadas en el esqueleto de un anticuerpo humano de estructura tridimensional conocida (*ver, por ejemplo*, WO98/45322, WO 87/02671, patente US 5.859.205, N° 5.585.089 y N° 4.816.567, solicitud de Patente EP 0173494, Jones, et al. *Nature* 321: 522 (1986), Verhoeyen, et al., *Science* 239: 1534 (1988), Riechmann, et al. *Nature* 332: 323 (1988), y Winter & Milstein, *Nature* 349: 293 (1991)) para formar un anticuerpo que causará escasa o ninguna respuesta inmunogénica cuando se administre a un ser humano. En forma alternativa, se pueden crear mediante ingeniería genética las regiones constantes de los anticuerpos reemplazando los residuos encontrados en animales no humanos tales como ratones, por residuos que se encuentran habitualmente en seres humanos. Los anticuerpos creados de esta forma

mediante ingeniería genética son denominados “anticuerpos humanizados” y se prefieren, porque ellos tienen un riesgo menor de inducir efectos colaterales y pueden permanecer en la circulación un tiempo más largo. Los métodos para humanizar anticuerpos son conocidos en la técnica y se muestran, por ejemplo, en las patentes US 6.180.377, US 6.407.213, US 5.693.762, US 5.585.089 y US 5.530.101.

El término “fragmentos de anticuerpo” significa moléculas que comprenden una parte de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos de Fv, anticuerpos de un solo dominio (*ver, por ejemplo, Wesolowski, Med Microbiol Immunol.* (2009) 198(3): 157-74, Saerens, *et al., Curr Opin Pharmacol.* (2008) 8(5): 600-8, Harmsen y de Haard, *Appl Microbiol Biotechnol.* (2007) 77(1): 13-22); anticuerpos de hélice estabilizada (*ver, por ejemplo, Arndt et al., J Mol Biol* 312:221-228 (2001), diacuerpos (*ver más adelante*), moléculas de anticuerpos de una cadena ("scFvs," *ver, por ejemplo, patente US 5,888,773*), anticuerpos estabilizados por disulfuro ("dsFvs", *ver, por ejemplo, patente US 5.747.654 y US 6.558.672*), y anticuerpos de dominio ("dAbs," *ver, por ejemplo, Holt et al., Trends Biotech* 21(11): 484-490 (2003), Ghahroudi *et al., FEBS Lett.* 414: 521-526 (1997), Lauwereys *et al., EMBO J* 17: 3512-3520 (1998), Reiter *et al., J. Mol. Biol.* 290: 685-698 (1999), Davies y Riechmann, *Biotechnology*, 13: 475-479 (2001)).

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio pesado variable ("V_H" o "VH") conectado a un dominio ligero variable ("V_L" o "VL") en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Al usar un linker que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios de complementariedad de otra cadena y se crean dos sitios de unión al antígeno. Se describen los diacuerpos y su producción en forma más detallada, por ejemplo, en la patente EP 404,097, WO 93/11161, y Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 6444-6448 (1993).

El término “anticuerpo parental” significa cualquier anticuerpo de interés que ha de ser mutado o variado para obtener anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unan al mismo epítipo que el anticuerpo parental, pero con una afinidad más alta.

Una “porción dirigida” es la parte del inmunoconjugado previsto para dirigir el inmunoconjugado a una célula de interés. Habitualmente, la porción dirigida es un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo que retiene la capacidad de reconocimiento del antígeno como por ejemplo, un scFv, un dsFv, un Fab, o un F(ab')₂.

Una “porción tóxica” es la parte de una inmunotoxina que vuelve citotóxica a la inmunotoxina para las células de interés. Con respecto a las inmunotoxinas que son materia de la presente invención, la porción tóxica es una exotoxina A de *Pseudomonas* que ha sido modificada / mutada para reducir su citotoxicidad no específica, según se describe con cierto detalle a continuación.

Habitualmente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y una cadena ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones son también conocidos como “dominios”). Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región de armazón interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR”. Se ha definido el alcance de la región de armazón y CDRs. Las secuencias de las regiones de armazón de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. La región de esqueleto o estructura de un anticuerpo, es decir, las regiones de estructura combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en un espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena son habitualmente denominadas CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas consecutivamente partiendo del extremo N-terminal, y habitualmente son identificadas por la cadena en la cual está ubicada la CDR determinada. Por lo tanto, una CDR3 de V_H está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el cual se encuentra, en tanto que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el cual se encuentra.

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

La frase “Fv de una cadena” o “scFV” se refiere a un anticuerpo en el cual los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas se han unido para formar una cadena. Habitualmente, se inserta un péptido linker entre las dos cadenas para permitir el plegamiento apropiado y creación de un sitio de unión activo.

La frase “enlace de disulfuro” o “enlace de disulfuro cisteína-cisteína” se refiere a una interacción covalente entre dos cisteínas en la cual se oxidan los átomos de azufre de las cisteínas para formar un enlace de disulfuro. La energía de enlace promedio de un enlace de disulfuro es de alrededor de 60 kcal/mol comparado con las 1-2 kcal/mol de un enlace de hidrógeno.

La frase “Fv estabilizado por disulfuro” o “dsFv” se refiere a la región variable de una inmunoglobulina en la cual hay un enlace disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada. En el contexto de la presente invención, las cisteínas que forman el enlace disulfuro están dentro de las regiones de estructura de las cadenas del anticuerpo y sirven para estabilizar la conformación del anticuerpo. Habitualmente, se crea el anticuerpo mediante ingeniería genética para introducir cisteínas en la región de la estructura en las posiciones donde la sustitución no interferirá en la unión al antígeno.

El término “péptido linker” incluye referencias a un péptido dentro de un fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, fragmento de Fv) que sirve directamente para unir de manera indirecta el dominio variable de la cadena pesada con el dominio variable de la cadena ligera.

El término “punto de gran actividad” (“hotspot”) significa una parte de una secuencia de nucleótido de una CDR o de una región de armazón de un dominio variable que es un sitio de una variación natural particularmente alta. Si bien se consideran las CDR como regiones de hipervariabilidad, se ha aprendido que las mutaciones no están distribuidas de manera uniforme a través de todas las CDR. Se

han identificado sitios determinados, o puntos de gran actividad, como los lugares que sufren mutaciones concentradas. Los puntos de gran actividad se caracterizan por una serie de secuencias y características estructurales. Se pueden usar estos “motivos de gran actividad” para identificar puntos de gran actividad. Dos motivos de secuencias consenso que están especialmente bien caracterizados son la secuencia de tetranucleótido RGYW y la secuencia de serina AGY, donde R es A o G, Y es C o T, y W es A o T.

Se puede generar un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno determinado mediante métodos recombinantes tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fago o en vectores similares, *ver, por ejemplo*, Huse, *et al.*, *Science* **246**: 1275-1281 (1989), Ward, *et al.*, *Nature* **341**: 544-546 (1989), y Vaughan, *et al.*, *Nature Biotech.* **14**: 309-314 (1996), o inmunizando un animal con el antígeno o con el ADN que codifica el antígeno.

El término “mitad efectora” significa la parte de un inmunoconjugado destinada a tener un efecto en una célula a la que se ha dirigido la porción dirigida o a identificar la presencia del inmunoconjugado. En el contexto de la presente invención, la mitad efectora es una exotoxina A de *Pseudomonas* modificada o mutada.

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

Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad eficaz para” o “cantidad terapéuticamente eficaz” incluyen referencia a una dosis de un agente terapéutico suficiente como para producir un resultado deseado, como por ejemplo, inhibir la síntesis de proteínas celulares en al menos un 50%, o eliminar la célula.

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

El término “poner en contacto” incluye referencia a colocación en asociación física directa.

Un “plásmido de expresión” comprende una secuencia de nucleótido que codifica una molécula de interés, que está unida de manera operable a un promotor.

Según se usa en la presente, “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan en forma intercambiable e incluyen referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente que se encuentra en la naturaleza, como también a polímeros de aminoácidos que se encuentran en la naturaleza. Asimismo, los términos se aplican a polímeros que contienen sustituciones de aminoácidos conservadoras de modo que la proteína siga siendo funcional.

El término “residuo” o “residuo de aminoácido” o “aminoácido” incluye referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido (colectivamente “péptido”).

El aminoácido puede ser un aminoácido que se encuentra en la naturaleza y, a menos que se limite de otro modo, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar en forma similar a los aminoácidos que se encuentran en la naturaleza.

Se describen los aminoácidos y análogos mencionados en la presente mediante denominaciones abreviadas que se muestran en la Tabla A a continuación:

Tabla A: Nomenclatura de los aminoácidos

Nombre	de 3 letras	de 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Homoserina	Hse	-

Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Metionina sulfóxido	Met (O)	-
Metionina		
metilsulfonio	Met (S-Me)	-
Norleucina	Nle	-
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Una “sustitución conservadora”, al describir una proteína, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera sustancialmente la actividad de la proteína. Por consiguiente, “variaciones modificadas en forma conservadora” de una secuencia de aminoácido determinada se refieren a sustituciones de aminoácido de estos aminoácidos que no son críticos para una actividad de proteína o sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos que tienen propiedades similares (*por ejemplo*, ácidos, básicos, cargados negativa o positivamente, polares o no polares, *etc.*) de manera que las sustituciones de los aminoácidos incluso críticos no alteren en forma sustancial la actividad. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los siguientes seis grupos que aparecen en la Tabla B contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras por otro:

Tabla B

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

Ver también Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties, W.H. Freeman and Company, New York (2^a Ed., 1992).

Los términos “conjugación”, “unión” o “ligamiento” se refieren a elaborar dos polipéptidos en una molécula de polipéptido contigua. En el contexto de la presente invención, los términos incluyen referencia a la unión de una mitad anticuerpo con una molécula efectora (EM). La unión puede ser a través de medios ya sea químicos o bien recombinantes. Si es química se refiere a una reacción entre la porción de anticuerpo y la molécula efectora de modo que haya un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula.

Según se usa en la presente, “recombinante” incluye referencia a una proteína producida usando células que no tienen, en su estado nativo, una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante, porque han sido alteradas genéticamente mediante la introducción de la secuencia de ácido nucleico aislada apropiada. Asimismo, el término incluye referencia a una célula, o ácido nucleico, o vector, que ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la alteración de un ácido nucleico nativo a una forma no nativa a esa célula, o que la célula es derivada de una célula modificada de esta manera. En consecuencia, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, expresan mutantes de genes que se encuentran dentro de la forma nativa, o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otro modo, se expresan a la baja o no se expresan en lo absoluto.

Según se usa en la presente, “ácido nucleico” o secuencia de ácido nucleico” incluye referencia a un polímero de ribonucleótido o desoxirribonucleótido en forma mono- o bicatenaria, y a menos que esté limitado de otro modo, abarca análogos de nucleótidos naturales que hibridizan a ácidos nucleicos en forma similar a los nucleótidos que se presentan en la naturaleza. A menos que se indique algo diferente, una secuencia de ácido nucleico determinada incluye la secuencia de complementariedad de la misma como también variantes conservadoras, es decir, ácidos nucleicos presentes en posiciones tambaleantes de codones y variantes que, cuando se traducen a una proteína, dan como resultado una sustitución conservadora de un aminoácido.

Según se usa en la presente, “que codifica” con respecto a un ácido nucleico especificado, incluye referencia a ácidos nucleicos que comprenden la información para la traducción a la proteína especificada. La información es especificada por el uso de codones. Habitualmente, la secuencia de aminoácidos es codificada por el ácido nucleico usando el código genético “universal”. Sin embargo, se pueden usar variantes del código universal, como por ejemplo, está presente en algunas mitocondrias de plantas, animales y hongos, la bacteria *Mycoplasma capricolum* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.* **82**: 2306-2309 (1985), o *Macronucleus* de ciliados, cuando el ácido nucleico es expresado usando la maquinaria de traducción de estos organismos.

La frase “fusión en marco” se refiere a unir dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de modo que la secuencia de ácido unida sea traducida a una proteína de cadena sencilla (“proteína de fusión”) que comprende las cadenas polipeptídicas originales.

Según se usa en la presente, “expresado” incluye referencia a la traducción de un ácido nucleico a una proteína. Las proteínas pueden expresarse y seguir siendo intracelulares, volverse un componente de la membrana superficial celular o ser secretadas en la matriz o medio extracelular.

Por “célula huésped” se entiende una célula que puede apoyar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células

procarióticas como por ejemplo, *E. coli*, o células eucarióticas tales como células de levadura, insecto, anfibio, o mamífero.

Los términos “idéntico” o “identidad” porcentual, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, según se miden usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

La frase “sustancialmente idénticas”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que tienen por lo menos un 60%, con mayor preferencia, un 65%, con mayor preferencia, un 70%, con mayor preferencia aún, un 75%, con mayor preferencia aún, un 80%, y con mayor preferencia aún, un 90%-95% de identidad de residuos de nucleótido o aminoácido, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, según se miden usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. De preferencia, la identidad sustancial existe en una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, con mayor preferencia, en una región de por lo menos alrededor de 100 residuos, y con mayor preferencia aún, las secuencias son sustancialmente idénticas en por lo menos aproximadamente 150 residuos. En una modalidad más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas en la longitud completa de un péptido de comparación o regiones de codificación.

En el caso de una comparación de secuencias, habitualmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se registran las secuencias de prueba y referencia en un computador, se designan coordenadas subsiguientes, si es necesario, y se designan parámetros de programas de algoritmos de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego el puntaje de identidad de secuencias para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados.

Se puede realizar un alineamiento óptimo de secuencias para realizar comparaciones, por ejemplo, mediante el uso del algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el uso del algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (*ver en general, Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y Altschuel *et al.* (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, respectivamente. El software para realizar los análisis BLAST está disponible para el público a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar los pares de secuencias con alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia en consulta que coincide o satisface con alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una base de datos de secuencias. T se denomina umbral de puntuación de palabra del vecindario. Estos aciertos iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulada. Se calculan las puntuaciones acumuladas usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos que coinciden; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos que coinciden; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. Se detienen los aciertos de extensión de de palabra

en cada dirección cuando: la puntuación de alineamiento acumulado disminuye en una cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a o es menor que cero, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa, o se ha alcanzado el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=4$, y una comparación de ambas hebras. En el caso de secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP (BLAST Protein) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (B) (ver Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*; 89: 10915 (1989)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencias, el algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 90: 5873- 5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma ($P(N)$), lo que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría una coincidencia al azar entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,1, o inferior a alrededor de 0,01, y con mayor preferencia aún es inferior a aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico presente reacción cruzada inmunológicamente con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, según se describe a continuación. En consecuencia, en forma habitual un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es

que las dos moléculas hibridizan entre sí bajo condiciones estrictas, según se describe a continuación.

El término “*in vivo*” incluye referencia a dentro del cuerpo del organismo del cual se obtuvo la célula. “*Ex vivo*” e “*in vitro*” significan fuera del cuerpo del organismo del cual se obtuvo la célula.

La frase “célula maligna” o “malignidad” se refiere a tumores o células tumorales que son invasivos y/o capaces de experimentar metástasis, es decir, una célula cancerosa.

Según se usa en la presente, “células de mamífero” incluyen referencias a células derivadas de mamíferos que incluyen seres humanos, ratas, ratones, conejillos de Indias, chimpancés o macacos. Se pueden cultivar las células *in vivo* o *in vitro*.

El término “selectivamente reactivo” se refiere, con respecto a un antígeno, a la asociación preferencial de un anticuerpo, en su totalidad o en parte, a una célula o tejido que lleva ese antígeno y no a células o tejidos que carecen de ese antígeno. Naturalmente, se reconoce que puede presentarse un cierto grado de interacción no específica entre una molécula y una célula o tejido no diana. No obstante, se puede distinguir la reactividad selectiva como mediada a través del reconocimiento específico del antígeno. Si bien anticuerpos selectivamente reactivos se unen al antígeno, ellos pueden hacerlo con una baja afinidad. Por otro lado, la unión específica da como resultado una asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo y las células que llevan el antígeno que entre el anticuerpo unido y células que carecen del antígeno. Habitualmente, la unión específica da como resultado un aumento de más de 5 veces, con mayor preferencia, más de 10 veces, y con mayor preferencia aún, de más de 100 veces, de la cantidad de anticuerpo unido (por unidad de tiempo) a una célula o tejido que lleva el antígeno blanco en comparación con una célula o tejido que carece del antígeno blanco. La unión específica a una proteína en tales condiciones requiere un anticuerpo que sea seleccionado en base a su especificidad por una proteína determinada. Una variedad de formatos de inmunoensayo es adecuada para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína determinada. Por ejemplo, en forma rutinaria se usan inmunoensayos ELISA de fase

sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunoreactivos con una proteína. Ver Harlow & Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual* (Anticuerpos, manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que se pueden usar para determinar la inmunoreactividad específica.

El término “condiciones inmunológicamente reactivas” incluye referencias a condiciones que permiten que un anticuerpo generado para un epítipo determinado se una a ese epítipo en un grado detectablemente mayor que, y/o con la exclusión sustancial de, se una sustancialmente a todos los demás epítopos. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión del anticuerpo y habitualmente son las utilizadas en los protocolos de inmunoensayo o en las condiciones encontradas *in vivo*. Ver en Harlow & Lane, *indicado anteriormente*, una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayos. De preferencia, las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los métodos de la presente invención son “condiciones fisiológicas” que incluyen referencias a condiciones (*por ejemplo*, temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas dentro de un mamífero vivo o una célula de mamífero. Si bien se reconoce que algunos órganos están sujetos a condiciones extremas, el medio ambiente intra-organismo e intracelular se encuentra normalmente a alrededor de un pH 7 (*es decir*, de un pH 6,0 a un pH 8,0, en forma más habitual, un pH 6,5 a 7,5), contiene agua como el disolvente predominante, y existe a una temperatura superior a 0°C e inferior a 50°C. La osmolaridad está dentro del rango que ayuda a la viabilidad y proliferación celular.

Los términos “paciente”, “sujeto”, “individuo” se refieren en forma intercambiable a un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un primate no humano, un mamífero domesticado (por ejemplo, un canino o felino), un mamífero agrícola (por ejemplo, un vacuno, porcino, ovino, equino), un mamífero de laboratorio (un ratón, rata, hámster, conejo).

El término “co-administrar” se refiere a la presencia simultánea de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Los agentes activos que se co-administran pueden ser entregados en forma concurrente o secuencial.

Según se usa en la presente, los términos “tratar” y “tratamiento” se refieren a demorar el inicio de, retardar o invertir el progreso de, o aliviar o prevenir ya sea la enfermedad o bien la condición a la cual se aplica el término, o uno o más síntomas de dicha enfermedad o condición.

Los términos “inhibir”, “reducir”, “disminuir” con respecto al crecimiento o progresión tumoral se refieren a inhibir el crecimiento, propagación, metástasis de un tumor o cáncer en un sujeto en una cantidad medible mediante cualquier método conocido en la técnica. Se inhibe, reduce o disminuye el crecimiento, progresión o propagación de un tumor o cáncer si la carga tumoral es reducida en por lo menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 50%, 80% o 100% en comparación con la carga tumoral antes de la co-administración de una PE de la presente invención, *por ejemplo*, como parte de una molécula quimérica. En algunas modalidades, se inhibe, reduce o disminuye el crecimiento, progresión o propagación de un tumor o cáncer en por lo menos alrededor de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o más en comparación con la carga tumoral antes de la administración de la PE.

Componentes de las inmunotoxinas recombinantes

A. Sitios de corte por furina (FCS)

El sitio de corte de furina puede ser cualquier sitio de polipéptido que pueda ser cortado por furina. Según se informa en Duckert et al., Protein Engineering, Design & Selection 17(1): 107-112 (2004) (en adelante, “Duckert et al.” y que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad y particularmente con respecto a las secuencias y motivos que pueden ser cortadas por furina divulgados en dicha referencia), la furina es una enzima de una “familia de serina proteasas dependientes de $CA2^+$ ”, específica dibásica y monobásica, evolutivamente conservadas denominadas proproteína convertasas de tipo subtilisina/kexina”. *Id.* en p. 107. La furina, conocida también como “enzima que cortado aminoácidos básicos pareados” o “PACE”, es uno de los siete miembros mamíferos de la familia y está implicada en el procesamiento de varias proteínas humanas endógenas. Ver en general, por ejemplo, Thomas G, *Nat Rev Mol Cell Biol*, (10): 753-66 (2002). Es una proteína asociada a membrana encontrada principalmente en la red trans-Golgi. Se ha conocido la secuencia de la furina humana

desde principios de los 90. Ver Hatsuzawa, K. et al., *J. Biol Chem.*, 267: 16094-16099 (1992), Molloy, S. et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 16396-16402 (1992).

Habitualmente, el sitio de corte mínimo está en el código de una sola letra para los residuos de aminoácidos, R-X-X-R, ocurriendo el corte después de la segunda “R”. Duckert et al. resumen la información disponible sobre las secuencias de 38 proteínas que en la literatura se informa tienen sitios de corte por furina, incluyendo proteínas mamíferas, proteínas de bacterias patógenas, y proteínas virales. Ellos informan que 31, o el 81%, de los motivos de corte revisados tenían una secuencia consenso R-X-[R/K]-R, de los cuales 11, o el 29%, tenía R-X-R-R, y 20, o el 52%, eran R-X-K-R. Tres de los motivos de corte contenían solo la secuencia mínima de corte. Además, Duckert et al. alinearon los motivos e identificaron los residuos encontrados en cada posición en cada furina para el motivo de corte mismo y en los residuos circundantes. La Figura A de Duckert et al. muestra por tamaño relativo los residuos más comúnmente encontrados en cada posición. Por convención, los residuos que rodean el sitio de corte de furina son numerados desde el enlace “fácilmente dividible” (“scissile”) (que es habitualmente indicado por el símbolo “↓”). Contando hacia el extremo N-terminal, los residuos del sustrato son designados P1, P2, etc. en tanto que contando hacia el extremo C-terminal, los residuos son designados P1', P2', etc. Ver, por ejemplo, Rockwell, N. C., y J. W. Thorner, *Trends Biochem. Sci.*, **29**: 0-87 (2004), Thomas G., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**: 753-766 (2002). Por lo tanto, de acuerdo a la convención, se puede usar la siguiente secuencia para alinear y numerar los residuos de la secuencia de corte mínimo y los residuos circundantes:

P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5',

donde la secuencia mínima de corte por furina es numerada como P4-P1. El alineamiento de Duckert et al de 38 secuencias cortadas por furina identifica las variaciones permitidas dependiendo de los residuos presentes en diversas posiciones. Por ejemplo, si el residuo en P4 no es una R, que se puede compensar teniendo residuos arginina o lisina en P2 y P6. *Id.* en p. 109.

En la PE nativa, el corte por furina ocurre entre arginina 279 y glicina 280 en un bucle rico en arginina ubicado en el dominio II de la toxina. La secuencia de corte por

furina nativa en el dominio II de la PE es mostrada a continuación (con los números indicando las posiciones de los residuos en la secuencia de PE nativa de 613 aminoácidos), y es alineada para mostrar su numeración en virtud de la convención mencionada anteriormente:

274- R H R Q P R G W E Q L -284 (SEQ ID NO: 17)

P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5'

En estudios que sirven de base para la presente invención, se realizaron sustituciones en las posiciones P3 y P2 para formar la siguiente secuencia, con las sustituciones subrayadas:

274- R H R S K R G W E Q L -284 (SEQ ID NO: 29).

Esta secuencia ha mostrado una velocidad de corte más rápida que la de la secuencia nativa, y cuando se usó en una inmunotoxina ejemplar produjo como resultado una citotoxicidad a las células blanco que fue aproximadamente la misma que la de la secuencia nativa.

En base a esto y a nuestros estudios previos, la secuencia de corte por furina usada para unir la molécula dirigida al dominio III de la PE puede ser la secuencia mínima de corte por furina, R-X-X-R, o cualquiera de las otras secuencias de corte por furina conocidas en la técnica o permitidas por la Figura 1A de Duckert et al., a condición de que, si hay un residuo presente en la posición identificada como P2', éste debiera ser triptofano o, si no es triptofano, no debiera ser valina o alanina. Por ejemplo, en algunas modalidades, la secuencia puede ser RKKR (SEQ ID NO: 30), RRRR (SEQ ID NO: 31), RKAR (SEQ ID NO: 32), SRVARS (SEQ ID NO: 33), TSSRKRRFW (SEQ ID NO: 34), o ASRRKARSW (SEQ ID NO: 35).

Según se indica en Duckert et al., se puede usar un residuo menos favorable que R (principalmente valina) en la posición P4 si es compensado por los residuos arginina o lisina en las posiciones P2 y P6, de modo que por lo menos dos de los tres residuos en P2, P4 y P6 sean básicos. En consecuencia, en algunas modalidades, la secuencia de corte por furina es RRVKKRFW (SEQ ID NO: 36), RNVVRRDW (SEQ ID NO: 37), o TRAVRRRSW (SEQ ID NO: 38). El residuo en la posición P1 puede ser la arginina presente en la secuencia nativa, o lisina. Por consiguiente, se puede sustituir una lisina

por la arginina en la posición P1 en, por ejemplo, cualquiera de las secuencias mostradas anteriormente.

En algunas modalidades, la secuencia de la secuencia que puede ser cortada por furina sigue la secuencia de la secuencia de corte por furina de la PE: R-H-R-Q-P-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO: 15) o una versión truncada de la secuencia nativa, siempre que contenga la secuencia de corte mínima por furina y pueda ser cortada por furina. Por lo tanto, en algunas modalidades, la secuencia que puede ser cortada por furina puede ser R-Q-P-R (SEQ ID NO: 39), R-H-R-Q-P-R-G-W (SEQ ID NO: 40), R-H-R-Q-P-R-G-W-E (SEQ ID NO: 41), H-R-Q-P-R-G-W-E-Q (SEQ ID NO: 42), o R-Q-P-R-G-W-E (SEQ ID NO: 43). En algunas modalidades, la secuencia es R-H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO: 29) o una versión truncada de esta secuencia, en tanto contenga la secuencia de corte mínima por furina y pueda ser cortada por furina. En consecuencia, en algunas modalidades, la secuencia que puede ser cortada por furina puede ser R-S-K-R (SEQ ID NO: 44), R-H-R-S-K-R-G-W (SEQ ID NO: 45), H-R-S-K-R-G-W-E (SEQ ID NO: 46), R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO: 47), H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO: 48), o R-H-R-S-K-R (SEQ ID NO: 49). Se puede probar fácilmente cualquier secuencia que puede ser cortada por furina determinada convirtiéndola en una inmunotoxina con el anticuerpo usado en SS1-LR y sometiendo a prueba la inmunotoxina resultante *in vitro* en una línea celular de mesotelina⁺.

Mediante métodos conocidos en la técnica se puede determinar si cualquier secuencia determinada puede o no ser cortada por furina. Por ejemplo, se puede probar si una secuencia puede o no ser cortada por furina incubando la secuencia con la furina en tampón de furina (NaOAc 0,2 M (pH 5,5), CaCl₂ 5 mM) en una relación molar 1:10 de enzima / sustrato a 25°C por 16 horas. Previamente, se establecieron estas condiciones como óptimas para el corte de la PE por furina. De preferencia, la furina usada es furina humana. La furina humana truncada recombinante está disponible en el comercio, por ejemplo, en New England Biolabs (Beverly, MA). Ver también Bravo et al., *J Biol Chem*, **269**(14): 25830-25837 (1994). Se enseña también sobre FCS adecuados en la Publicación de Patente PCT N° WO 2009/032954, publicada el 12 de marzo de 2009) y

que es incorporada por referencia en la presente particularmente con respecto a las secuencias de corte por furina divulgadas en la misma.

B. Dominio funcional III

Estructuralmente, se entiende que el dominio Ib comprende los residuos 365-399. Según se habla en forma más detallada en la presente, si bien se considera que el límite estructural del dominio III de la PE comienza en el residuo 405, análisis funcionales han mostrado que el dominio III requiere que un segmento del dominio estructural Ib mantenga una actividad de ADP-ribosilación. En consecuencia, se define el dominio funcional III como los residuos 395-613 de la PE, y por lo tanto, se prefiere que las toxinas de la invención comprendan los residuos 395-613 de la PE, describiéndose ciertas variaciones permitidas en forma más detallada más abajo. La delección de los residuos 365-394 que no sean los de la secuencia de corte por furina es conveniente, porque las eliminaciones remueven cualquiera de los epítomos inmunogénicos presentes en estas partes de la molécula de PE. En las PE de la invención, una secuencia de corte por furina, o variantes truncadas o modificadas de la misma, está unida en su extremo carboxilo al dominio III, teniendo interpuesto entre las dos un linker flexible de de 3 a 8 aminoácidos seleccionados en forma independiente de glicina y serina.

En modalidades preferidas, se modifica el dominio funcional de las moléculas de PE para que tengan una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de los residuos de aminoácidos normalmente presentes en las posiciones D406 y Q592 dentro del Dominio III. Se pueden combinar las sustituciones en las posiciones D406 y Q592 con sustituciones de alanina, glicina, serina o glutamina en las posiciones R432, R467, R490, R513, E548 y K590 dentro del Dominio III. En algunas modalidades, además, por lo menos un residuo de aminoácido que corresponde a un residuo de aminoácido en una posición seleccionada de D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 está sustituido por una alanina, glicina, serina o glutamina. Las sustituciones a los residuos en posiciones de sustitución dentro de las posiciones III D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 de residuos de aminoácidos del Dominio III. En algunas modalidades, el dominio funcional III de la PE

es sustancialmente idéntico o es idéntico a la secuencia de aminoácidos del dominio funcional de PE del SS1-LR/GGS/8M. En algunas modalidades, el dominio funcional III de PE es sustancialmente idéntico o es idéntico a la secuencia de aminoácidos del dominio funcional de PE del SS1-LR/GGS/8X.

Se entiende que la secuencia de la PE nativa y las variantes mencionadas anteriormente pueden tener sustituciones conservadoras y mantener una capacidad citotóxica e, idealmente, una antigenicidad reducida en comparación con la secuencia nativa de PE. En modalidades preferidas, las variantes modificadas de PE o fragmentos citotóxicos de la misma tienen una similitud de secuencia de al menos un 80%, de preferencia, una similitud de secuencia de por lo menos un 85%, con mayor preferencia, una similitud de secuencia de al menos un 90%, y con mayor preferencia aún, una similitud de secuencia de por lo menos un 95% a nivel de aminoácido, con el dominio funcional III de interés de la PE, el de SS1-LR/GGS/8M o SS1-LR/GGS/8M. La Publicación PCT N° WO/2011/032022 publicada el 17 de marzo de 2011 y correspondiente a la PCT/US2010/048504 presentada el 10 de septiembre de 2010, divulga mutaciones adecuadas que reducen la antigenicidad del dominio funcional II de la PE. Esta solicitud publicada es incorporada por referencia en su totalidad con respecto a las mutaciones y sustituciones y moléculas divulgadas en la misma que proporcionan la inmunogenicidad reducida de un Dominio funcional III.

El término “variantes modificadas en forma conservadora” se aplica a secuencias tanto de aminoácido como de ácido nucleico. Con respecto a las secuencias de ácido nucleico determinadas, las variantes modificadas en forma conservadora se refieren a aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o si el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácido, a secuencias de ácido nucleico esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido determinado. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por consiguiente, en cada posición donde una alanina es especificada por un codón, se puede alterar el codón a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido

codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas en forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica un polipéptido describe también cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un especialista en la materia reconocerá que se puede modificar cada codón en un ácido nucleico (exceptuando AUG, que es comúnmente el único codón para metionina) para que produzca una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a secuencias de aminoácidos, un especialista en la materia reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína que alteran, adicionan o delecionan un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada son una “variante modificada en forma conservadora” donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar.

Ensayo de la citotoxicidad o antigenicidad de la PE

Se pueden someter a ensayo las exotoxinas de *Pseudomonas* empleadas en la invención en lo que respecta al nivel deseado de citotoxicidad mediante ensayos bien conocidos por los especialistas en la materia. Por consiguiente, se pueden someter los fragmentos citotóxicos de PE y variantes modificadas en forma conservadora de dichos fragmentos fácilmente a ensayos de citotoxicidad. Se puede someter a ensayos una gran cantidad de moléculas candidatas de PE en forma simultánea en lo que concierne a citotoxicidad mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden someter subgrupos de las moléculas candidatas a ensayo de citotoxicidad. Se pueden subdividir en forma continua subgrupos de moléculas candidatas que reaccionan positivamente y se pueden volver a someter a ensayo hasta que se identifique(n) el(los) fragmento(s) citotóxico(s) deseado(s). Tales métodos permiten un rápido tamizaje de grandes cantidades de fragmentos citotóxicos o variantes conservadoras de la PE. Se pueden realizar ensayos de antigenicidad mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los ensayos mencionados en la publicación WO 2007/016150.

C. Anticuerpos anti-mesotelina

El componente de direccionamiento de la molécula quimérica se une en forma específica a la mesotelina marcadora de superficie celular. Los antígenos de la superficie celular que son blancos para las moléculas quiméricas son bien conocidos en la técnica, y se resumen, por ejemplo, en Mufson, *Front Biosci* (2006) 11: 337-43, Frankel, *Clin Cancer Res* (2000) 6:326-334 y Kreitman, *AAPS Journal* (2006) 8(3): E532-E551. Los ejemplos de tipos de cáncer cuyo crecimiento, propagación y/o progresión puede ser reducida o inhibida dirigiendo hacia mesotelina incluyen cáncer ovárico, mesotelioma, cáncer pulmonar de células no pequeñas, adenocarcinoma pulmonar, cáncer de trompas de falopio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical y cáncer pancreático. En otra modalidad preferida, la porción dirigida es un fragmento de anticuerpo, de preferencia, un fragmento de anticuerpo que se une en forma específica a un marcador superficial en una célula. Un fragmento de anticuerpo preferido es un Fv de cadena sencilla. En la presente, se describen la construcción y caracterización de las inmunotoxinas a base de citotoxina donde se fusiona la citotoxina con un scFv. Otros fragmentos de anticuerpo preferidos con los cuales se puede fusionar una toxina o fragmento citotóxico incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, fragmento Fv, un anticuerpo estabilizado en cuanto hélice, un diacuerpo, un anticuerpo estabilizado por disulfuro, y un anticuerpo de un solo dominio (por ejemplo, un anticuerpo de camélido). Los anticuerpos contra la mesotelina incluyen SS1, SSP1, HN1, HN2, MN, K1 y variantes de los mismos. El MORAb-009 (una versión humanizada del SS1) es un anticuerpo particularmente adecuado.

Se ha mostrado que SS1P destruye específicamente las líneas celulares que expresan mesotelina y que en ratones causa regresiones de los tumores que expresan la mesotelina (Hassan, R. et al., *Clin Cancer Res* 8:3520-6 (2002), Onda, M. et al., *Cancer Res* 61:5070-7 (2001)). En base a estos estudios y datos de seguridad pertinentes, se están realizando 2 estudios de fase 1 con SS1P en el Instituto Nacional del Cáncer en pacientes con cánceres que expresan mesotelina (Chowdhury, P. S. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 669-74 (1998), Hassan, R. et al., *Proc Am Soc Clin Oncol* 21: 29a (2002), cada uno incorporado en la presente por referencia con respecto

al asunto del SS1P divulgado en la misma). Además, otras terapias dirigidas hacia la mesotelina están en desarrollo preclínico (Thomas, A.M. et al., *J Exp Med* 200: 297-306 (2004)). HN1 y HN2 son anticuerpos anti-mesotelina humanos, descritos por ejemplo, en Feng, et al., *Mol Cancer Ther* (2009) 8(5): 1113-8. Las inmunotoxinas de SS1P en las que se han removido clústers de corte para las proteasas lisosomales. Estas variantes se describen, por ejemplo, en Weldon, et al., *Blood*, (2009) 113(16): 3792-800 y en WO 2009/032954, que se incorporan en la presente en su totalidad con respecto a los anticuerpos, FCS y dominios funcionales III divulgados en las mismas.

Las RIT de la invención incluyen, pero no están limitadas a, moléculas en las cuales existe un enlace covalente de una molécula de PE con un anticuerpo u otro agente dirigido. La fusión de una citotoxina a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ocurre habitualmente en un extremo C-terminal del anticuerpo o fragmento del anticuerpo. Habitualmente, se realiza dicha fusión empleando tecnologías de ADN recombinante. La elección de un agente dirigido determinado depende de la célula particular a la cual se ha de dirigir el agente. Los anticuerpos que son dirigidos a la inmunotoxina pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes, como por ejemplo, quimeras o fragmentos de región variable. Si el anticuerpo es no recombinante, se debe formar la inmunotoxina mediante la conjugación química del anticuerpo con la porción tóxica. Si se produce el anticuerpo en forma recombinante, se puede unir el anticuerpo a la toxina a través de un enlace químico o a través de una fusión recombinante. En una fusión recombinante, el ADNc que codifica el anticuerpo se inserta, dentro de marco, en el plásmido que ya contiene ADNc que codifica la toxina. Naturalmente, también se podría hacer lo contrario; se puede insertar el ADNc de la toxina en un plásmido que porta el ADNc que codifica el anticuerpo. Debido al potencial tamaño grande de la inmunotoxina, a veces es conveniente unir solo un fragmento de un anticuerpo a la porción tóxica. Se pueden fabricar fragmentos Fab, Fab' y F(ab)₂ a partir de los anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos y luego unirse a la toxina a través de un enlace químico. En forma alternativa, se puede producir un ADNc en el cual se conectan las regiones variables de un anticuerpo con regiones de estructura esenciales. Luego estos anticuerpos más pequeños son secretados como

anticuerpos Fv de cadena doble o, si se unen las regiones de cadena ligera y pesada ya sea directamente o bien a través de un linker peptídico, como anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv). Los fragmentos y anticuerpos contra la mesotelina particularmente preferidos, donde se remueven los clústers de corte para las proteasas lisosomales, se dan a conocer en la publicación de solicitud de patente PCT N° WO/2000/073346, publicada el 12 de julio de 2000, que corresponde a la PCT/US2009/014829, presentada el 26 de mayo de 2000, cedida al mismo cesionario que la presente invención, y que es incorporada por referencia en su totalidad particularmente con respecto a a materia del anticuerpo divulgado en la misma.

Un método para crear un scFv es a través de bibliotecas de despliegue en fago hechas de ARNm esplénico de ratones inmunizados con un inmunógeno (Chowdhury, *et al.*, *Mol. Immunol.* **34**: 9-20 (1997)). Sin embargo, si un inmunógeno de proteína se encuentra en la naturaleza en mamíferos, pero se expresa recombinantemente en procariotas, la proteína no tendrá el patrón correcto de glicosilación y puede que no tenga la conformación correcta. Los anticuerpos desarrollados por el ratón en respuesta a este inmunógeno pueden no reconocer la proteína en su estado nativo. Una solución para este problema es inmunizar los animales con la proteína nativa hecha en células de mamífero, pero puede que no sea posible la purificación de cantidades suficientes de algunas proteínas a partir de células de mamífero, en particular proteínas de superficie celular. Otra solución, si bien no es tan común, es inmunizar animales con ADNc que codifica el inmunógeno. El ADNc, bajo el control de un promotor adecuado, es introducido en el animal. Después de inyecciones de refuerzo y cuando el título de anticuerpo alcanza un máximo, se sacrifican los animales y se retiran los bazo para crear la biblioteca de despliegue en fago. Inmunizando ratones con plásmidos que contienen ADN que codifica mesotelina, estamos en condiciones de obtener títulos altos de anticuerpos anti-mesotelina. Usando ARN esplénico y tecnología de despliegue en fago, se puede aislar un Fv de cadena sencilla ("scFv"), que denominamos SS scFv, que se une con una alta afinidad a la mesotelina.

Los anticuerpos anti-mesotelina para usar en la presente invención pueden estar unidos a los FCS a través del extremo terminal amino de los FCS. En forma similar, los

FCS pueden estar unidos directamente a las regiones ligera, pesada, Fc (región constante) o de estructura del anticuerpo. La unión puede ocurrir a través de los extremos amino o carboxilo-terminales del anticuerpo, o a través de un residuo de aminoácido interior. Los anticuerpos usados en una composición de inmunoconjugado multivalente de la presente invención pueden ser dirigidos a los mismos epítomos de la mesotelina o a diferentes epítomos de la mesotelina.

En modalidades preferidas de la presente invención, el anticuerpo anti-mesotelina es un anticuerpo recombinante como por ejemplo, un scFv o un anticuerpo Fv estabilizado por disulfuro. Los anticuerpos Fv son habitualmente de alrededor de 25 kDa y contienen un sitio de unión al antígeno completo con 3 CDRs por cadena pesada y liviana. Si la cadena de V_H y la cadena de V_L son expresadas en forma no contigua, las cadenas del anticuerpo Fv son habitualmente mantenidas juntas mediante interacciones no covalentes. No obstante, estas cadenas tienden a disociarse en la dilución, por lo que se han desarrollado métodos para entrecruzar las cadenas a través de glutaraldehído, disulfuros intermoleculares o un linker peptídico.

En una modalidad particularmente preferida, el anticuerpo es un Fv de cadena sencilla (scFv). Las regiones V_H y V_L de un anticuerpo scFv comprenden una cadena sencilla que se pliega para crear un sitio de unión al antígeno similar al encontrado en anticuerpos de dos cadenas. Una vez plegada, las interacciones no covalentes estabilizan el anticuerpo de cadena sencilla. En una modalidad más preferida, se produce el svFc en forma recombinante. Un especialista en la materia se dará cuenta de que se pueden fabricar variantes conservadoras de los anticuerpos de la presente invención. Dichas variantes conservadoras empleadas en los fragmentos de scFv conservarán los residuos de aminoácidos necesarios que son críticos para un plegamiento y estabilización correctos entre las regiones V_H y V_L . En algunas modalidades de la presente invención, el anticuerpo scFv está directamente unido a los FCS a través de la cadena ligera.

Si bien las regiones V_H y V_L de algunas modalidades de anticuerpo pueden estar directamente unidas, un especialista en la materia apreciará que las regiones pueden estar separadas por un linker peptídico compuesto por uno o más aminoácidos. Los

linkers peptídicos y su uso son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Huston, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **8**: 5879 (1988), Bird, *et al.*, *Science* **242**: 4236 (1988), Glockshuber, *et al.*, *Biochemistry* **29**:1362 (1990), patente US 4.946.778, patente US 5.132.405 y Stemmer, *et al.*, *Biotechniques* **14**: 256-265 (1993), todos incorporados en la presente por referencia. Generalmente, el linker peptídico no tendrá actividad biológica específica que no sea la de unir las regiones o preservar cierta distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. No obstante, se pueden seleccionar los aminoácidos constituyentes del linker peptídico para influir en cierta propiedad de la molécula como por ejemplo, el plegamiento, carga neta o hidrofobicidad. Los anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) incluyen en forma opcional un linker peptídico de no más de 50 aminoácidos, generalmente no más de 40 aminoácidos, de preferencia, no más de 30 aminoácidos, y con mayor preferencia, no más de 20 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el linker peptídico es un concatémero de la secuencia Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 50), de preferencia, 2, 3, 4, 5 o 6 de estas secuencias. No obstante, se ha de apreciar que se pueden realizar algunas sustituciones de aminoácidos dentro del linker. Por ejemplo, se puede sustituir una valina por una glicina.

De preferencia, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera de anticuerpo mutado, teniendo el polipéptido por lo menos una afinidad de unión por lo menos 5 veces más alta por un antígeno que un anticuerpo parental, teniendo el polipéptido una secuencia que difiere del anticuerpo parental por una sustitución de aminoácidos de al menos un aminoácido en una región determinante de la complementariedad (CDR), el aminoácido codificado por un codón que comprende un nucleótido que pertenece a un motivo de gran actividad seleccionado de AGY o RGYW, donde R es A o G, Y es C o T y W es A o T. La sustitución puede ocurrir en la CDR3 de una región variable de cadena ligera o pesada. La sustitución puede ocurrir en la CDR1 o la CDR2 de una región variable de cadena ligera o pesada. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-mesotelina es un material de anticuerpo divulgado en la patente US 7.081.518, concedida el 25 de julio

de 2006 y que es incorporada por referencia con respecto a dichos anticuerpos, sus secuencias de ácido nucleico, usos y métodos de fabricación.

El anticuerpo anti-mesotelina puede comprender una cadena pesada variable ("V_H") y una cadena ligera variable ("V_L"), cadenas V_H y V_L que tienen cada una una primera, una segunda y una tercera región determinante de la complementariedad ("CDR"), donde la primera CDR ("CDR1"), la segunda CDR ("CDR2") y una tercera CDR ("CDR3"), respectivamente, de dicha cadena pesada tienen la secuencia de residuos de aminoácidos mostrada para CDR1 (GYTMN; SEQ ID NO: 51), CDR2 (LITPYNGASSYNQKFRG; SEQ ID NO: 52), y CDR3 (GGYDGRGFDY; SEQ ID NO: 53), y donde las CDR 1, 2 y 3 respectivamente, de dicha cadena V_L tienen la secuencia de residuos de aminoácidos mostrada para CDR1 (SASSSVSYM_H; SEQ ID NO: 54), CDR2 (DTSKLAS; SEQ ID NO: 55), y CDR3 (QQWSGYPLT; SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, la CDR3 de la cadena ligera es modificada y tiene la secuencia QQWSKHPLT (SEQ ID NO: 57), QQWSGHPLT (SEQ ID NO: 58), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 59), QQWSQIPLT (SEQ ID NO: 60), QQWGFNPLT (SEQ ID NO: 61), QQWG_{TN}PLT (SEQ ID NO: 62), QQWGS_HPLT (SEQ ID NO: 63), QQWG_{DF}PLT (SEQ ID NO: 64), QQWG_{DH}PLT (SEQ ID NO: 65), QQWSA_HPLT (SEQ ID NO: 66), o QQWSG_{YPTT} (SEQ ID NO: 67). En algunas modalidades, la V_H está conectada con la V_L por un péptido linker, GVGGSG₄SG₄S (SEQ ID NO: 25). En algunas otras modalidades, el anticuerpo anti-mesotelina es un scFv, dsFv, Fab, o F(ab')₂. En algunas otras modalidades más, el anticuerpo anti-mesotelina que ha de ser usado en la RIT comprende una sustitución de aminoácidos de por lo menos un aminoácido en una CDR seleccionada del grupo compuesto por una CDR1 de V_L, una CDR2 de V_L, una CDR1 de V_H y una CDR2 de V_H, estando dicho aminoácido codificado por un codón que comprende un nucleótido que pertenece a un motivo de gran actividad seleccionado AGY o RGYW, donde R es A o G, Y es C o T y W es A o T.

D. L1

El anticuerpo está unido al FCS por un linker adicional que, de preferencia, es un enlace o un polipéptido de 1 a 10 aminoácidos continuos de longitud. En algunas modalidades, este linker es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 aminoácidos de longitud. En

algunas modalidades preferidas, el linker está compuesto por residuos glicina y serina. En algunas otras modalidades, el linker es ASGG (SEQ ID NO: 19) o ASGGSGGG (SEQ ID NO: 68). En modalidades preferidas, el linker forma una cadena polipeptídica continua que une directamente un extremo carboxilo terminal del anticuerpo con el extremo N-terminal del FCS.

E. El linker flexible

El linker flexible acopla directamente el FCS al Dominio funcional III de la PE. El linker flexible es un péptido continuo de la fórmula $(Xaa1)_n$ donde Xaa1 es seleccionado en forma independiente de glicina y serina y n es de 3 a 8. En modalidades preferidas, n es 3. En una modalidad preferida, el linker es GGS. En otras modalidades, n es 4, 5, 6, o 7. En otras modalidades, el linker flexible es GGGS (SEQ ID NO: 50), GGGSG (SEQ ID NO: 69), GGGGSG (SEQ ID NO: 70) o GGSGGS (SEQ ID NO: 18).

El linker flexible está fusionado en secuencia con el extremo C-terminal del FCS y fusionado directamente en secuencia con el dominio funcional III de la PE y, en consecuencia, forma una cadena peptídica continua con el FCS y el dominio funcional III.

Producción de inmunoconjugados

i. Métodos no recombinantes

En una modalidad no recombinante de la invención, se une una molécula dirigida como por ejemplo, un anticuerpo, a una molécula de PE de la presente invención usando cualquier número de medios conocidos para los especialistas en la materia. Se pueden usar medios de unión covalente y no covalente con moléculas de PE de la presente invención.

El procedimiento para unir una molécula de PE con un anticuerpo u otra molécula dirigida ("TM") variará de acuerdo a la estructura química de la TM. Habitualmente, los polipéptidos contienen una variedad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo, por ejemplo, para dar como resultado la unión de la molécula de PE.

De manera alternativa, se deriva el anticuerpo u otra TM para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivación puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas linker como por ejemplo, las que están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

Un “linker”, según se usa en la presente, es una molécula que se usa para unir la TM a la molécula PE. El linker es capaz de formar enlaces covalentes con tanto el anticuerpo como con la molécula efectora. Los linkers adecuados son bien conocidos por los especialistas en la materia e incluyen, pero no están limitados a, linkers de carbono de cadena recta o ramificada, linkers de carbono heterocíclicos, o linkers de péptido. Donde el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, se pueden unir los linkers a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína). No obstante, en una modalidad preferida, se unirán los linkers a los grupos amino y carboxilo de carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En algunas circunstancias, resulta conveniente liberar la molécula de PE de la TM cuando el inmunoconjugado ha alcanzado su sitio blanco. Por lo tanto, en estas circunstancias, los inmunoconjugados comprenderán enlaces que son posibles de cortar en las inmediaciones del sitio blanco. El corte del linker para liberar la molécula de PE de la TM puede ser provocado por actividad o condiciones enzimáticas a la cual se somete el inmunoconjugado ya sea dentro de la célula diana o bien en las inmediaciones del sitio blanco. Cuando el sitio blanco es un tumor, se puede usar un linker que se pueda cortar bajo condiciones presentes en el sitio tumoral (por ejemplo, cuando es expuesto a enzimas asociadas a tumor o pH ácido).

ii. Métodos recombinantes

Se pueden preparar las secuencias de ácido nucleico de la presente invención mediante cualquier método adecuado incluyendo, por ejemplo, clonación de las secuencias apropiadas o mediante síntesis química directa a través de métodos tales como el método del fosfotriéster de Narang, *et al.*, *Meth. Enzymol.* **68**: 90-99 (1979), el método del fosfodiéster de Brown, *et al.*, *Meth. Enzymol.* **68**: 109-151 (1979), el método de la dietilfosforamidita de Beaucage, *et al.*, *Tetra. Lett.* **22**:1859-1862 (1981), el método

del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage & Caruthers, *Tetra. Letts.* **22**(20): 1859-1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado según se describe en, por ejemplo, Needham-VanDevanter, *et al. Nucl. Acids Res.* **12**: 6159-6168 (1984), y el método de soporte sólido de la patente US 4.448.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario, el cual se puede convertir en un ADN bicatenario mediante hibridización con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la hebra única como plantilla. Un especialista en la materia reconocerá que si bien la síntesis química del ADN está limitada a secuencias de alrededor de 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligazón de secuencias más cortas.

En una modalidad preferida, se preparan secuencias de ácido nucleico de la presente invención mediante técnicas de clonación. Ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación adecuadas, e instrucciones suficientes como para dirigir personas especializadas a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY (Clonación molecular: Manual de laboratorio) (2ª Ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), Berger y Kimmel (eds.), GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES (Guía hacia las técnicas de clonación molecular), Academic Press, Inc., San Diego CA (1987)), o Ausubel, *et al.* (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY ((Protocolos actuales en biología molecular), Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY (1987). La información de producto y del equipo experimental por los fabricantes de reactivos biológicos también proporcionan información útil. Tales fabricantes incluyen la compañía química SIGMA (Saint Louis, MO), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen, San Diego, CA, y Applied Biosystems (Foster City, CA), como también muchas otras fuentes comerciales conocidas para un especialista.

Asimismo, se pueden modificar ácidos nucleicos que codifican una PE nativa para formar los inmunos conjugados de la presente invención. La modificación mediante mutagénesis sitio dirigida es bien conocida en la técnica. Se pueden amplificar los ácidos nucleicos que codifican la PE mediante métodos *in vitro*. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación autosostenida de frecuencia (3SR). Una amplia variedad de métodos de clonación, células huésped, y metodologías de amplificación *in vitro* es bien conocida por los especialistas en la materia.

En una modalidad preferida, se preparan inmunos conjugados insertando el ADNc que codifica un anticuerpo u otra TM de elección en un vector que comprende el ADNc que codifica una PE deseada de la invención. Se realiza la inserción de modo que el agente dirigido (a fin de facilitar la discusión en la presente, ésta asumirá que el agente dirigido es un Fv, si bien se podrían sustituir otros agentes dirigidos con igual efecto) y la PE sean leídos en marco, es decir, en un polipéptido continuo que contiene una región de Fv funcional y una región funcional de la PE. En una modalidad particularmente preferida, el ADNc que codifica una PE de la invención está ligado a un scFv de modo que la toxina está ubicada en el extremo carboxilo terminal del scFv. En otras modalidades preferidas, el ADNc que codifica una PE de la invención está ligado a un scFv de manera que la toxina esté ubicada en el extremo amino terminal del scFv.

Una vez que los ácidos nucleicos que codifican una PE, anticuerpo, o un inmunos conjugado de la presente invención sean aislados y clonados, se puede expresar la proteína deseada en una célula creada recombinantemente mediante ingeniería como por ejemplo, células bacterianas, de planta, levaduras, de insecto y de mamífero. Se espera que los especialistas en la materia estén informados de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levaduras y diversas células eucarióticas superiores como por ejemplo, líneas celulares de mieloma, COS, CHO y HeLa. No se hará ningún intento por describir en forma detallada los diversos métodos conocidos para la expresión de proteínas en procarióticas y eucarióticas. En resumen,

habitualmente, se logrará la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican las proteínas aisladas de la invención uniendo en forma operable el ADN o ADNc a un promotor (que es constitutivo o inducible), seguido por la incorporación en un cassette de expresión. Los cassettes pueden ser adecuados para la replicación e incorporación en procarióticas o eucarióticas. Los cassettes de expresión típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencia de iniciación, y promotores útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Para obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado, es conveniente construir cassettes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para la transcripción directa, un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción, y un terminador de transcripción/traducción. Para la *E. coli* esto incluye un promotor como por ejemplo, los promotores T7, trp, lac o lambda, un sitio de unión al ribosoma y, de preferencia, una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucarióticas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y, de preferencia, un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias de empalme donantes y receptoras. Se pueden transferir los cassettes de la invención en la célula huésped escogida mediante métodos bien conocidos tales como transformación de cloruro de calcio o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para las células de mamífero. Se pueden seleccionar las células transformadas por los cassettes por resistencia a los antibióticos conferida por los genes contenidos en los cassettes como por ejemplo, los genes *amp*, *gpt*, *neo* y *hyg*.

Un especialista en la materia reconocerá que se pueden realizar modificaciones a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención (es decir, PE o inmunoconjugado formado a partir de una PE de la invención) sin disminuir su actividad biológica. Se pueden efectuar algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula dirigida en una proteína de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas por los especialistas en la materia e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina agregada en el extremo amino terminal para proporcionar una iniciación, sitio, aminoácidos adicionales colocados en cualquier

extremo terminal para crear sitios de restricción ubicados convenientemente, o aminoácidos adicionales (como por ejemplo, poly His) para ayudar a las etapas de purificación.

Además de los métodos recombinantes, se pueden construir también los inmunoconjugados y las PE de la presente invención en su totalidad o en parte usando síntesis de péptidos estándar. Se puede realizar la síntesis en fase sólida de los polipéptidos de la presente invención de menos de alrededor de 50 aminoácidos de longitud uniendo el aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Técnicas para la síntesis en fase sólida son descritas por Barany & Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* . Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A. (Los péptidos, análisis, síntesis, biología. Vol 2: Métodos especiales en la síntesis de péptidos, Parte A), págs. 3-284; Merrifield, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2149-2156 (1963), y Stewart, *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Síntesis en fase sólida de péptidos), 2^a ed. , Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Se pueden sintetizar proteínas de mayor longitud mediante la condensación de los extremos amino y carboxilo terminales de fragmentos más cortos. Los métodos para formar enlaces de péptido mediante la activación de un extremo carboxilo terminal (por ejemplo, mediante el uso del reactivo de acoplamiento N, N'-diciclohexilcarbodiimida) son conocidos por los especialistas en la materia.

iii. Purificación

Una vez expresados, se pueden purificar los inmunoconjugados recombinantes y las PE de la presente invención de acuerdo a procedimientos estándares de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía de columna, y procedimientos similares (*ver*, en general, R. Scopes, *Protein Purification* (Purificación de proteínas), Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos alrededor de un 90% a un 95% de homogeneidad, y se prefieren aún más las que tienen un 98% a un 99% o más de homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificados, en forma parcial o hasta la homogeneidad

deseada, si se han de usar terapéuticamente, los polipéptidos debieran estar sustancialmente libres de endotoxina.

Los métodos para la expresión de anticuerpos de cadena sencilla y/o el repliegue a una forma activa apropiada, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, a partir de bacterias tales como *E. coli* han sido descritos y son bien conocidos y son aplicables a los anticuerpos de la presente invención. Ver, por ejemplo, Buchner, *et al.*, *Anal. Biochem.* **205**: 263-270 (1992), Pluckthun, *Biotechnology* **9**: 545 (1991), Huse, *et al.*, *Science* **246**: 1275 (1989) y Ward, *et al.*, *Nature* **341**: 544 (1989), todos incorporados por referencia en la presente.

Con frecuencia, se aíslan proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias, desde cuerpos de inclusión y dichas proteínas requieren solubilización usando desnaturalizantes fuertes, y replegamiento posterior. Durante la etapa de solubilización, según se conoce bien en la técnica, debe estar presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un ejemplo de tampón con un agente reductor es: Tris pH 8 0,1 M, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE 0,3 M (ditioeritritol). La reoxidación de los enlaces disulfuro puede ocurrir en presencia de reactivos de tiol de bajo peso molecular en una forma reducida y oxidada, según se describe en Saxena, *et al.*, *Biochemistry* **9**: 5015-5021 (1970), incorporado por referencia en la presente, y especialmente según se describe en Buchner, *et al.*, antes indicado.

En forma habitual, la renaturalización se realiza diluyendo (por ejemplo, 100 veces) la proteína desnaturalizada y reducida en un tampón de replegamiento. Un ejemplo de tampón es Tris 0,1 M, pH 8.0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8 mM, y EDTA 2 mM.

Como una modificación al protocolo de purificación de anticuerpos de dos cadenas, se solubilizan las regiones de cadena ligera y pesada en forma separada y se reducen y luego se combinan en la solución de replegamiento. Se obtiene una producción preferida cuando se mezclan estas dos proteínas en una relación molar de modo que no se exceda en 5 veces el exceso molar de una proteína por sobre la otra. Resulta conveniente agregar exceso de glutatión oxidado u otros compuestos de peso

molecular bajo oxidantes a la solución de replegamiento después de que se ha completado un aleatorio de redox (“redox shuffling”).

2. Composiciones farmacéuticas y administración

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica o un medicamento que comprende al menos una proteína quimérica de la presente invención, de preferencia una toxina dirigida y, en forma opcional un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica o medicamento pueden ser administrados a un paciente para el tratamiento de una patología, incluyendo, pero no limitado a, una enfermedad maligna o cáncer.

a. Formulación

Las composiciones farmacéuticas o medicamentos que se usan en la presente invención pueden ser formulados a través de técnicas estándares usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. En la presente, se describen portadores farmacéuticos adecuados en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins (2005). Se pueden formular las proteínas quiméricas de la presente invención para ser administradas por cualquier vía adecuada, incluyendo inhalación, forma tópica, oral, parenteral o rectal. En consecuencia, la administración de la composición farmacéutica se puede hacer por inyección intradérmica, subdérmica, intravenosa, intramuscular, intranasal, por inhalación, intracerebral, intratraqueal, intraarterial, intraperitoneal, intravesical, intrapleural, intracoronaria, subcutánea o intratumoral, con una jeringa u otros dispositivos. También se contempla la administración transdérmica, como la inhalación o administración por aerosol. Las tabletas y cápsulas pueden ser administradas de manera oral, rectal o vaginal.

Las composiciones para la administración comúnmente comprenderán una solución de la proteína quimérica, de preferencia una toxina dirigida, disuelta en un portador farmacéuticamente aceptable, de preferencia un portador acuoso. Se puede usar una variedad de portadores acuosos, como por ejemplo una solución salina tamponada y otros similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materias no deseadas. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante

técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables que se requieran para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como por ejemplo, agentes de ajuste del pH y tamponamiento, agentes de ajuste de la toxicidad y otros similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y otros similares. La concentración de la proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente, y será seleccionada principalmente en base a los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y otros similares en conformidad con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del paciente.

Las composiciones de toxina dirigida de esta invención son adecuadas para administración parenteral, incluyendo la administración intravenosa o la administración en una cavidad del cuerpo.

Las proteínas quiméricas, de preferencia las toxinas dirigidas, de la presente invención pueden ser formuladas para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden ser presentadas en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en contenedores de dosis múltiples, con un preservante agregado. Las composiciones inyectables son, de preferencia, soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan de preferencia a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden ser esterilizadas y/o contener adyuvantes, como por ejemplo agentes preservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmóticas y/o tampones. De manera alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua esterilizada libre de pirógeno, antes de su uso. Además, pueden contener también otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones son preparadas conforme a métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen aproximadamente 0,1% a 75%, de preferencia aproximadamente 1% a 50%, del ingrediente activo.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones de toxina dirigida de la presente invención pueden estar preparadas como implantes, inyecciones aceitosas o como sistemas particulados. Para un panorama amplio de los sistemas de entrega de proteína, ver Banga, A.J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Deliver Systems* (Péptidos y proteínas terapéuticas: Formulación, procesamiento y sistema de entrega), Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995), incorporado en la presente por referencia. Los sistemas particulados incluyen microesferas, macropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como núcleo central. En las microesferas, el efecto terapéutico se dispersa en toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas menores a aproximadamente 1 μm son generalmente denominadas nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los vasos capilares tienen un diámetro de alrededor de 5 μm , de modo que solo las nanopartículas son administradas por vía intravenosa. Las micropartículas habitualmente tienen alrededor de 100 μm de diámetro y son administradas subcutánea o intramuscularmente.; ver, por ejemplo, Kreuter J., *Colloidal Drug Delivery Systems* (Sistema de entrega de fármaco coloidal), J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, págs. 219-342 (1994); y Tice & Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, págs. 315-339 (1992), ambos incorporados en la presente por referencia.

Se pueden usar polímeros para la liberación controlada por iones de las composiciones de toxina dirigida de la presente invención. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para ser usadas en la entrega controlada de fármaco (Langer R., *Accounts Chem. Res.*, 26:537-542 (1993)). Por ejemplo, el copolímero en bloque, polaxámero 407, existe en la forma de un líquido viscoso, pero aún así es móvil a temperaturas bajas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Ha demostrado ser un vehículo efectivo para la formulación y entrega sostenida de interleuquina 2 recombinante y ureasa (Johnston et al., *Pharm. Res.*, 9: 425-434 (1992); y Pec et al., *J. Parent. Sci. Tech.*, 44(2):58-65 (1990)). De manera alternativa se ha usado la hidroxiapatita como un microportador para la entrega

controlada de proteínas (Ijntema et al., *Int. J. Pharm.*, 112: 215-224 (1994)). Incluso en otro aspecto, se usan liposomas para la liberación controlada, así como para dirigir el fármaco encapsulado en lípido (Betageri et al., *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la entrega controlada de proteínas terapéuticas; ver, por ejemplo, patentes US 5.055.303, US 5.188.837, US 4.235.871, US 4.501.728, US 4.837.028, US 4.957.735 y US 5.019.369, US 5.055.303, US 5.514.670, US 5.413.797, US 5.268.164, US 5.004.697, US 4.902.505, US 5.506.206, US 5.271.961, US 5.254.342 y US 5.534.496. cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia.

Las formulaciones adecuadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de una composición de la presente invención con un portador. Los portadores preferidos incluyen solventes absorbibles farmacológicamente aceptables que ayudan a su paso a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos tienen la forma de una venda que comprende un elemento de refuerzo, un depósito que contiene la composición, opcionalmente con portadores, en forma opcional una barrera que controla la velocidad para entregar la composición a la piel del huésped en una proporción controlada y predeterminada en un periodo de tiempo prolongado, y medios para asegurar el dispositivo a la piel. También se pueden usar formulaciones de matriz transdérmicas.

Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y ojos, son preferentemente soluciones acuosas, ungüentos, cremas o geles bien conocidos en la técnica. Pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes que mejoran la tonicidad, soluciones tampón y preservantes.

Para la administración oral, una composición farmacéutica o un medicamento puede adoptar la forma de, por ejemplo, una tableta o cápsula preparada a través de medios convencionales con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se prefieren las tabletas y cápsulas de gelatina que comprenden el ingrediente activo, es decir, una composición de la presente invención, junto con (a) diluyentes o rellenos, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa (por ejemplo, etil celulosa,

celulosa microcristalina), glicina, pectina, poliacrilatos y/o calcio hidrógeno fosfato, sulfato de calcio), (b) lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de calcio o magnesio, estearatos metálicos, dióxido de silicio coloidal, aceite vegetal hidrogenado, almidón de maíz, benzoato de sodio, acetato de sodio y/o polietilenglicol; para tabletas también (c) aglutinantes, por ejemplo, silicato aluminio magnesio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona y/o hidroxipropil metilcelulosa; si se desea (d) desintegrantes, por ejemplo, almidones (por ejemplo, almidón de papa o almidón de sodio), glicolato, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; (e) agentes humectantes, por ejemplo, lauril sulfato de sodio y/o (f) absorbentes, colorantes, saborizantes y endulzantes.

Las tabletas pueden tener recubrimiento de película o recubrimiento entérico conforme a los métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden ser presentados como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden ser preparadas a través de medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agentes en suspensión, por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de la celulosa o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina o acacia; vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados; y preservantes, por ejemplo, metil- o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico. Las preparaciones pueden también contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y/o endulzantes, según sea pertinente. Si se desea, las preparaciones para administración oral pueden ser adecuadamente formuladas para entregar liberación controlada de la composición activa.

Para la administración por inhalación, la proteína quimérica, de preferencia un anticuerpo y/o toxina dirigida, puede ser entregada de manera conveniente en la forma de una presentación en aerosol a partir de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano,

triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, 1,1,1,2-tetrafluoroetan, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, se puede determinar la unidad de dosificación proporcionando una válvula para entregar una cantidad medida. Pueden ser formuladas cápsulas y cartuchos, por ejemplo de, gelatina, para usar en un inhalador o insuflador, de modo que contengan una mezcla en polvo de la proteína quimérica, de preferencia, un anticuerpo y/o toxina dirigida y una base de polvo adecuada, por ejemplo, lactosa o almidón.

Las composiciones pueden también ser formuladas en composiciones rectales, por ejemplo, supositorios o enemas de retención, que, por ejemplo, contengan bases de supositorio convencionales, como mantequilla de cacao u otros glicéridos.

Además, las composiciones pueden ser formuladas como una preparación de depósito. Dichas preparaciones de acción prolongada pueden ser administradas mediante implante (por ejemplo, de manera subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De esta forma, por ejemplo, la composición puede ser formulada con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o con resinas de intercambio iónico, o como derivados regularmente solubles, por ejemplo, como una sal regularmente soluble.

Las composiciones pueden, si así se desea, ser presentadas en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o plástica como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones de administración.

b. Dosificación

En una modalidad de la presente invención, se administra una composición farmacéutica o medicamento a un paciente a una dosis terapéuticamente efectiva para prevenir, tratar o controlar una enfermedad o patología maligna, como el cáncer. Se administra la composición farmacéutica o medicamento a un paciente en una cantidad suficiente como para provocar una respuesta terapéutica o diagnóstica efectiva en el paciente. Una respuesta terapéutica o diagnóstica efectiva es una respuesta que detiene al menos parcialmente o retarda los síntomas o complicaciones de la

enfermedad o condición maligna. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una “dosis terapéuticamente eficaz”.

La dosificación de las proteínas quiméricas, de preferencia, toxinas dirigidas, o composiciones administradas, depende de la especie de animal de sangre caliente (mamífero), peso corporal, edad, condición individual, área superficial de la zona que será tratada y de la forma de administración. La magnitud de la dosis será determinada por la existencia, la naturaleza y extensión de cualquier efecto adverso que acompaña a la administración de un compuesto determinado en un sujeto en particular. Una dosis unitaria para administrar a un mamífero de aproximadamente 50 a 70 kilos puede contener entre aproximadamente 5 y 500 mg del ingrediente activo. Habitualmente, una dosis del compuesto de la presente invención es una dosis suficiente para alcanzar el efecto deseado.

Se pueden calcular los programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de la proteína quimérica, de preferencia la toxina dirigida, la acumulación en el cuerpo de un sujeto. En general, la dosificación es de 1 ng a 1.000 mg por kilo de peso corporal y puede ser administrada una vez o más veces al día, a la semana, al mes o al año. Los que tienen un conocimiento común y corriente en la materia pueden determinar fácilmente las dosis óptimas, las metodologías de dosificación y las veces que se administrarán. Un especialista en la materia será capaz de determinar la dosificación óptima para la administración de una proteína quimérica, de preferencia, una toxina dirigida, a un ser humano conforme a los protocolos establecidos conocidos en la técnica y en la divulgación de la presente.

Las dosis óptimas, la toxicidad y la eficiencia terapéutica de las composiciones podrán variar dependiendo de la potencia relativa de cada composición y pueden ser determinadas a través de procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, mediante determinación de la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede ser expresada como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren las composiciones que presentan índices terapéuticos grandes. Si bien se pueden usar

composiciones que exhiban efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de entrega que dirija dichas composiciones al lugar de tejido afectado, con el fin de minimizar el daño potencial para las células normales y, con ello, reducir los efectos secundarios.

Se pueden usar los datos obtenidos de, por ejemplo, estudios en animales (como roedores y monos) para formular un rango de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de los compuestos de la presente invención se encuentra, de preferencia, dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango, dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración. Para cualquier composición que se usará en los métodos de la invención, se puede calcular la dosis terapéuticamente efectiva inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para alcanzar un rango de concentración plasmática en circulación que incluye la IC_{50} (la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición máxima media de los síntomas) según se determine en el cultivo celular. Se puede usar dicha información para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Por ejemplo, se pueden medir los niveles en el plasma a través de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En general, el equivalente de dosis de una proteína quimérica, de preferencia una toxina dirigida, es de entre aproximadamente 1 ng/kg y 100 mg/kg para un sujeto común.

Una composición de toxina dirigida habitual de la presente invención para administración intravenosa sería de entre alrededor de 0,1 y 10 mg por paciente al día. Se pueden usar dosificaciones de 0,1 a aproximadamente 100 mg por paciente al día. Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los especialistas en la materia y se describen con mayor detalle en publicaciones como *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins (2005).

Los ejemplos de dosis de las composiciones descritos en la presente, incluyen cantidades de la composición en miligramos o microgramos por kilogramo de peso del sujeto o de muestra (por ejemplo, entre alrededor de 1 microgramo por kilogramo y

alrededor de 500 miligramos por kilogramo, aproximadamente 100 microgramos por kilogramo y alrededor de 5 miligramos por kilogramo, o alrededor de 1 microgramo por kilogramo y aproximadamente 50 microgramos por kilogramo. Además, se entiende que las dosis apropiadas de una composición dependen de la potencia de la composición con respecto al efecto deseado que se desea alcanzar. Cuando se debe administrar una o más de estas composiciones a un mamífero, un médico, veterinario o investigador pueden, por ejemplo, recetar una dosis relativamente baja en principio, para ir posteriormente aumentando la dosis hasta obtener una respuesta apropiada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto mamífero en particular dependerá de una variedad de factores, entre los que se incluye la actividad de la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el género y dieta del sujeto, la hora de administración, la vía de administración, la proporción de excreción, la combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad que se debe modular.

En una modalidad de la presente invención, se administra una composición farmacéutica o medicamento que comprende una proteína quimérica, de preferencia una toxina dirigida, de la presente invención, por ejemplo en una dosis diaria del orden de aproximadamente 1 mg del compuesto por kg de peso del sujeto (1 mg/kg) y alrededor de 1g/kg. En otra modalidad, la dosis es una dosis del orden de aproximadamente 5 mg/kg y alrededor de 500 mg/kg. Incluso en otra modalidad, la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg y alrededor de 250 mg/kg. En otra modalidad, la dosis es de aproximadamente 25 mg/kg y alrededor de 150 mg/kg. Una dosis preferida es de aproximadamente 10 mg/kg. Se puede administrar la dosis diaria una vez al día o se puede dividir en sub-dosis y administrar en dosis múltiples, como por ejemplo, dos, tres o cuatro veces al día. Sin embargo, como lo podrá apreciar un especialista en la materia, las composiciones descritas en la presente podrán ser administradas en cantidades diferentes y a horas diferentes. Este mismo especialista se dará cuenta también de que ciertos factores pueden influir en la dosificación y horarios que se requieren para tratar a un sujeto de manera eficaz, lo que incluye, pero no se limita a, la severidad de la enfermedad o la condición maligna, los tratamientos

anteriores, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición puede incluir un tratamiento único o, de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos.

Después de un tratamiento exitoso, es probable que se desee someter al sujeto a una terapia de mantención, con el fin de impedir la recurrencia de la enfermedad o condición maligna tratada.

c. Administración

Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones son administradas a un paciente que sufre de una enfermedad o condición maligna, como el cáncer, en una cantidad suficiente como para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una “dosis terapéuticamente eficaz”. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la severidad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es aquella que proporciona ya sea un alivio subjetivo de uno o varios síntomas o bien una mejoría objetivamente identificable por parte del médico u otro observador calificado.

La determinación de una cantidad eficaz se encuentra dentro de las capacidades de los especialistas en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada entregada en la presente. Generalmente, una cantidad eficaz o efectiva de un inmunoconjugado se determina administrando primero una dosis baja o cantidad pequeña del inmunoconjugado, y aumentando luego de manera incremental la dosis administrada, agregando un segundo o tercer medicamento si fuera necesario, hasta que se observe el efecto deseado en el sujeto bajo tratamiento con mínimos o ningún efecto secundario.

La administración única o múltiple de las composiciones depende de la dosis y la frecuencia que se requiera y sea tolerada por el paciente. En todo caso, la composición debe entregar una cantidad suficiente de las proteínas de esta invención para tratar al paciente de manera eficaz. De preferencia, la dosis es administrada una vez, pero se

puede aplicar de manera periódica hasta alcanzar un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifiquen la discontinuación de la terapia. Generalmente, la dosis es suficiente para tratar o aliviar los síntomas o señales de la enfermedad sin producir una toxicidad inaceptable al paciente.

Para alcanzar el efecto terapéutico deseado, las composiciones pueden ser administradas por múltiples días a la dosis diaria terapéuticamente eficaz. De esta forma, la administración terapéuticamente eficaz de las composiciones para tratar una enfermedad o condición maligna descritas en la presente en un sujeto puede requerir una administración periódica (por ejemplo diaria) que continúe por un periodo que fluctúe entre tres días y dos semanas o más. Habitualmente, se administrarán las composiciones por al menos tres días consecutivos, a menudo por al menos cinco días consecutivos, con mayor frecuencia, por al menos diez días, y a veces por 20, 30, 40 o más días consecutivos. Si bien las dosis diarias consecutivas son una vía preferida para alcanzar una dosis terapéuticamente eficaz, se puede alcanzar un efecto terapéuticamente beneficioso aun cuando los compuestos o composiciones no sean administrados en forma diaria, en la medida que la administración se repita con la frecuencia suficiente como para mantener una concentración terapéuticamente eficaz de la composición en el sujeto. Por ejemplo, se puede administrar una composición día por medio, cada tres días o, si se emplean dosis mayores y son toleradas por el sujeto, una vez a la semana.

3. Métodos para inhibir el crecimiento tumoral

Las composiciones de la presente invención pueden ser usadas en una variedad de formas. Por ejemplo, las moléculas de PE de la presente invención, como parte de la molécula quimérica, se pueden usar para (i) inducir la apoptosis en una célula que lleva uno o más marcadores superficiales, (ii) inhibir el crecimiento no deseado, la hiperproliferación o la sobrevida de una célula que lleva uno o más marcadores celulares superficiales, (iii) tratar una patología como un cáncer, y (iv) entregar terapia a un mamífero que ha desarrollado una enfermedad provocada por la presencia de células que llevan uno o más marcadores celulares superficiales.

Se puede usar cualquier célula o célula tumoral que exprese mesotelina como un marcador celular superficial para practicar un método de la presente invención. Los métodos de la presente invención pueden ser practicados *in vitro* o *in vivo*. Cuando hay referencia a una célula, se entiende que este término incluye también una población de células, es decir, más de una célula.

Uso de las composiciones para inducir la apoptosis en una célula que lleva uno o más marcadores celulares superficiales

La apoptosis desempeña un papel fundamental tanto en el desarrollo como en la homeostasis de los organismos multicelulares. “Apoptosis” se refiere a la muerte celular programada y se caracteriza por ciertas características celulares tales como formación de burbujas en la membrana, condensación y fragmentación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y un patrón de tinción [patrón de tinción positivo “TUNEL” (marcación del extremo libre por dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal). Una etapa posterior en el proceso apoptótico es la degradación de la membrana plasmática, que hace que las células apoptóticas sean permeables a diversas tinturas (por ejemplo, yoduro de propidio).

La apoptosis puede ser inducida a través de múltiples vías de señalización independientes que convergen en un mecanismo efector final que consta de múltiples interacciones entre varios receptores de muerte y sus ligandos, los que pertenecen a la superfamilia de receptor/ligando del factor de necrosis tumoral (TNF). Los receptores de muerte mejor caracterizados son CD95 (“Fas”), TNFR1 (p55), el receptor de muerte 3 (DR3 o Apo3/TRAMO), DR4 y DR5 (apo2-TRAIL-R2). El mecanismo de efector final de la apoptosis es la activación de una serie de proteinasas denominadas como caspasas. La activación de estas caspasas produce el corte de una serie de proteínas celulares vitales y la muerte celular.

La presente invención proporciona métodos para inducir la apoptosis en una célula que expresa mesotelina. En un aspecto, el método para inducir la apoptosis en una célula comprende la etapa de exponer o contactar la célula que expresa la mesotelina como un marcador de superficie celular a una RIT de la presente invención. Habitualmente, las células son expuestas a o contactadas con cantidades eficaces del

inmunoconjugado, en que la puesta en contacto da como resultado la inducción de la apoptosis.

En otro aspecto de la presente invención, se entrega un método para inducir una célula tumoral que expresa la mesotelina en su superficie para experimentar la apoptosis, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una RIT de la presente invención.

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

Un objetivo de la presente invención es entregar mejores estrategias terapéuticas para el tratamiento de cánceres usando las composiciones de la invención. En un aspecto de la presente invención, se entrega un método para inhibir al menos un crecimiento no deseado, la hiperproliferación o la sobrevida de una célula. Este método comprende la etapa de contactar una célula que expresa mesotelina como un marcador de superficie con una cantidad eficaz de una PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, según se describe en la presente, donde la etapa de puesta en contacto da como resultado la inhibición de al menos un crecimiento no deseado, la hiperproliferación o la sobrevida de una célula. En una modalidad, este método comprende la etapa de determinar si la célula expresa uno o más marcadores de superficie celular, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Habitualmente, las células son expuestas a o contactadas con cantidad eficaces del inmunoconjugado, en que la puesta en contacto da como resultado la inhibición de al menos un crecimiento no deseado, la hiperproliferación o la sobrevida de una célula.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento de una población de células que llevan mesotelina. En una modalidad preferida, este método comprende las etapas de (a) contactar una población de células con una proteína quimérica conforme a la invención. Muchos tumores forman metástasis. Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, se usan las composiciones de la presente invención para prevenir la formación de una metástasis. Este método comprende la etapa de administrar a una célula tumoral una composición de la presente invención, en que la administración provoca la prevención

de la metástasis. En una modalidad preferida, la composición comprende una toxina dirigida que incluye un anticuerpo contra un antígeno superficial celular y una PE de la presente invención. Habitualmente, las células son expuestas a o contactadas con cantidades eficaces de inmunoconjugado, en que la puesta en contacto da como resultado la prevención de la metástasis. Los ejemplos de cánceres, cuyo crecimiento, propagación y/o progresión pueden ser inhibidos, incluyen cáncer de ovarios, mesotelioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y cáncer pancreático.

Uso de las composiciones para tratar el cáncer

Los métodos de la presente invención pueden ser practicados *in vitro* e *in vivo*. En consecuencia, en otro aspecto de la presente invención, se entrega un método para tratar a un sujeto que sufre de una condición cancerosa. Este método comprende la etapa de administrar a un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer, cantidades terapéuticamente eficaces de la RIT de la invención, según se describe en la presente, donde la condición cancerosa se caracteriza por crecimiento no deseado o la proliferación de una célula que expresa uno o más marcadores de superficie celular, y donde la etapa de administración da como resultado el tratamiento del sujeto. Habitualmente, las células se exponen a o se contactan con cantidades eficaces de la inmunotoxina, donde la puesta en contacto da como resultado el tratamiento del sujeto.

En una modalidad de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que sufre de un cáncer mediado por la interacción de unión de mesotelina y CA125. Los ejemplos de cánceres, cuyo crecimiento, propagación y/o progresión son al menos parcialmente mediados por la unión de CA125/mesotelina, incluyen cáncer de ovarios, mesotelioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y cáncer pancreático.

Los métodos para tratar el cáncer pueden, opcionalmente, comprender una o más de las siguientes etapas: obtención de una muestra biológica de tejido o fluido de una persona; tamizaje de la muestra biológica para la expresión de la mesotelina poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo dirigido al marcador de

superficie o tamizaje de la muestra biológica para la expresión del polinucleótido del marcador de superficie detectando un ARNm del marcador de superficie. Esto se puede hacer usando tecnologías estándares conocidas en la técnica, como por ejemplo Western blotting, Northern blotting o PCR.

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

También se proporciona un método para entregar terapia a un mamífero que ha desarrollado una enfermedad causada por la presencia o proliferación aberrante de células que de preferencia llevan o sobreexpresan la mesotelina. En una modalidad preferida, este método comprende la etapa de administrar al citado mamífero una RIT de la invención. Habitualmente, las células son expuestas a o contactadas con cantidades efectivas de la inmunotoxina, donde la puesta en contacto da como resultado el tratamiento del sujeto.

En otra modalidad, esta invención proporciona la eliminación de células blanco *in vitro* o *ex vivo*, usando las RIT de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar moléculas quiméricas que comprenden las RIT de la invención para purgar las células de interés de una población de células en un cultivo. Por consiguiente, por ejemplo, las células cultivadas de un paciente que tiene un cáncer que expresa mesotelina, pueden ser purgadas de células cancerosas poniendo en contacto el cultivo con moléculas quiméricas dirigidas contra la mesotelina según se describe en la presente.

En algunos casos, las células blanco pueden estar contenidas dentro de una muestra biológica. Según se usa en la presente, una “muestra biológica” es una muestra de tejido biológico o fluido que contiene células blanco y células no blanco. Dichas muestras incluyen, pero no se limitan a, tejido de biopsias, sangre y células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos). Habitualmente, una muestra biológica se obtiene de eucariota multicelular, de preferencia, de un mamífero como por ejemplo, una rata, ratón, vaca, perro, conejillo de Indias o conejo, y con mayor preferencia, de un primate, como por ejemplo, un macaco, un chimpancé o un ser humano. Con mayor preferencia aún, la muestra es de un humano.

Métodos para monitorear la respuesta a un tratamiento con una RIT de la invención

La invención proporciona métodos para detectar la inhibición del crecimiento tumoral en un paciente que sufre de o es susceptible a un cáncer que puede ser tratado con una RIT de la invención. Los métodos son especialmente útiles para monitorear un curso de tratamiento que está siendo administrado a un paciente que usa RIT de la presente invención. Se pueden usar los métodos para monitorear tanto el tratamiento terapéutico en los pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en los pacientes asintomáticos.

Los métodos de monitoreo implican determinar un valor basal de la carga tumoral en un paciente antes de administrar una dosis de las RIT de la presente invención y comparar esto con un valor para la carga tumoral después del tratamiento, o con la carga tumoral en un paciente que no recibe tratamiento.

Una reducción significativa (es decir, mayor al margen habitual de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresada como la desviación estándar en relación a la media de dichas mediciones) en el valor de la carga tumoral, señala un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración de las RIT de la presente invención ha bloqueado la progresión del crecimiento tumoral y/o la metástasis).

En otros métodos, se determina un valor de control (es decir, una desviación media y estándar) de la carga tumoral para una población control o una población normal (por ejemplo, carga = cero). Habitualmente, las personas en la población control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de la carga tumoral en un paciente después de la administración de las RIT de la presente invención, son entonces comparados con el valor control. Una disminución significativa en la carga tumoral en relación con el valor de control (por ejemplo, mayor a la desviación estándar en relación a la media) indica un resultado de tratamiento positivo. La falta de disminución significativa o un aumento indica un resultado de tratamiento negativo.

En otros métodos, un valor de control de la carga tumoral (por ejemplo, una desviación media y estándar) es determinado a partir de una población control de

personas que han sido sometidas a tratamiento recibiendo un régimen de RIT de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, según se describe en la presente. Los valores medidos de carga tumoral en un paciente son comparados con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, mayor a la desviación estándar) al valor de control, se puede discontinuar el tratamiento. Si el nivel de carga tumoral en un paciente es significativamente superior al valor de control, se justifica la administración continua de un agente.

En otros métodos, un paciente que no está recibiendo actualmente tratamiento, pero que ha sido sometido a un curso previo de tratamiento, es monitoreado en relación a la carga tumoral para determinar si se requiere o no la reanudación de tratamiento. El valor medido de la carga tumoral en el paciente puede ser comparado con un valor de carga tumoral previamente alcanzado en el paciente después de un curso de tratamiento previo. Un aumento significativo en la carga tumoral en relación a la medición previa (es decir, mayor al margen habitual de error en las mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que se el tratamiento debe ser reanudado. De manera alternativa, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de pasar por un curso de tratamiento. En forma alternativa, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control en las poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen libres de los síntomas de la enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que demuestran mejoría en las características de la enfermedad. En todos estos casos, un aumento en la carga tumoral en relación al nivel de control (esto es, más de una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debiera ser reanudado en un paciente.

La muestra de tejido para análisis es habitualmente sangre, plasma, suero, mucosa, biopsia a un tejido, tumor, ascitis o líquido cefalorraquídeo del paciente. Se puede analizar la muestra para ver si hay indicación de neoplasia. La neoplasia o carga tumoral puede ser detectada usando cualquier método conocido en la técnica, por

ejemplo, la observación visual de una biopsia por parte de un patólogo calificado, u otras técnicas de visualización, por ejemplo radiografía, ultrasonido, imagen de resonancia magnética (IMR).

KITS, ENVASES, DISPOSITIVOS Y SISTEMAS

La invención también entrega kits y sistemas para ser usados en aplicaciones de diagnóstico, investigación y terapéuticas. Los kits de la presente invención comprenderán una RIT de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula química. Además, los kits y sistemas pueden incluir material pedagógico que contienen instrucciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de la presente invención. Las instrucciones pueden estar presentes en los kits de sujetos en una variedad de formas, pudiendo estar presentes una o más de ellas en el kit. Si bien los materiales de instrucción habitualmente comprenden materiales escritos o impresos, no están limitados a ellos. Cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final está contemplado en esta invención. Dichos medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y otros similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que entregan dichos materiales de instrucción.

Se puede preparar una amplia variedad de kits, sistemas y composiciones según la presente invención, dependiendo del usuario previsto del kit y sistema y de las necesidades particulares del usuario.

Se entregan kits con dosis unitarias de la composición activa, por ejemplo en dosis orales, vaginales, rectales, transdérmicas o inyectables (por ejemplo, para inyección intramuscular, intravenosa o subcutánea). En dichos kits, además de los envases que incluyen las dosis unitarias, habrá un prospecto de envase que describe el uso y beneficios de la composición en el tratamiento de una enfermedad o condición maligna. Las composiciones activas adecuadas y las dosis unitarias son aquellas descritas anteriormente en la presente.

Si bien la invención anterior ha sido descrita en forma algo más detallada a través de ilustraciones y ejemplos, cuyo objetivo es aportar claridad y entendimiento, una

persona con un conocimiento común y corriente en la materia se dará cuenta con facilidad – a la luz de las enseñanzas de esta invención – de que se pueden hacer ciertas variaciones, cambios, modificaciones y sustituciones de equivalentes sin apartarse necesariamente del espíritu y alcance de esta invención. Como resultado de ello, las modalidades descritas en la presente están sujetas a diversas modificaciones, cambios y otros similares, determinándose el alcance de la presente invención únicamente en referencia a las reivindicaciones adjuntas a la presente. Los especialistas en la materia reconocerán con facilidad una variedad de parámetros no críticos que podrían ser cambiados, alterados o modificados para proporcionar resultados básicamente similares. También se debe entender que la terminología usada en la presente tiene como objetivo describir solo modalidades particulares y no tiene como intención ser restrictiva, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Aun cuando cada elemento de la presente invención es descrito en la presente como que incluye múltiples modalidades, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario, cada una de las modalidades de un determinado elemento de la presente invención puede ser usado con cada una de las modalidades de los demás elementos de la presente invención y cada uno de sus usos tiene como objetivo formar una modalidad diferente de la presente invención.

Las patentes, solicitudes de patentes y literatura científica mencionada, incluyendo los números de acceso a las secuencias de bases de datos GenBank, mencionadas en la presente son incorporadas por la presente por referencia en su totalidad, como si se indicara específica e individualmente que cada publicación, patente o solicitud de patente individual es incorporada por referencia. Cualquier conflicto entre cualquier referencia citada en la presente y las enseñanzas específicas de esta especificación deberá ser resuelto a favor de las últimas. Del mismo modo, cualquier conflicto entre una definición de una palabra o frase entendida en la técnica y una definición de la palabra o frase específicamente enseñada en esta especificación, deberá ser resuelto en favor de esta última.

Como se puede advertir de la divulgación anterior, la presente invención tiene una amplia variedad de aplicaciones.

La invención es además ilustrada por los siguientes ejemplos, los que son solo ilustrativos y no tienen como objetivo limitar de ninguna forma la definición y alcance de la invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplo se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada,

Proteína

Se expresaron el SS1P (SS1 (dsFv)-PE38) y todos los mutantes derivados del SS1P en *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) a partir de vectores para (VH)-PE de SS1 y SS1 (VL, y posteriormente replegadas y purificadas según se describe (Pastan I, Beers R, y Bera TK, *Methods Mol Biol.*, 248: 503-18 (2004)). Stocks de SS1P fueron preparados por Advanced BioScience Laboratories, Inc. (Kensington, MD). Todas las demás RIT fueron preparadas en el Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, MD). Se generaron mutaciones en el SS1P usando mutagénesis sitio dirigida Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA) con partidores de Lofstrand Labs Limited (Gaithersburg, MD).

Líneas celulares

En este estudio se usó una variedad de líneas celulares derivadas de humanos positivas para mesotelina. Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar L55 y mesotelioma M30 fueron proporcionadas por el Dr. Steven Sibelda, Universidad de Pensilvania (Filadelfia, PA). La línea celular de mesotelioma HAY fue provista por la Stehlin Foundation for Cancer Research (Houston TX). Las líneas celulares de cáncer ovárico OVCAR-8 y A1847 fueron proporcionadas por el Dr. Hisataka Kobayashi y el Dr. Dr. S. Aaronson, respectivamente, en el Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, MD). Se obtuvo la línea celular de adenocarcinoma pulmonar NCI-H322M del Dr. Mitchell Ho en el Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, MD). La línea celular KB31 es un subclon de la línea celular KB de carcinoma epidermoide humano (Akiyama S et al., *Somat Cell Mol Genet.*, 11(2): 117-26 (1985)). La línea celular A431/K5 es un derivado de la línea

celular de carcinoma epidermoide A431 que es transfectada con mesotelina humana (Chowdhury PS et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95: 669-674 (1998)) y cultivada con medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con FBS 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U, 100 µg de estreptomicina, y 70 µg/mL de G-418 (geneticina). A menos que se especifique de otro modo, todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C con CO₂ 5% en medio RPMI-1640 complementado con FBS 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U, y 100 µg de estreptomicina (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Ensayos de citotoxicidad

Se midió la viabilidad de las líneas celulares tratadas con inmunotoxinas usando el ensayo WST-8 Kit de Conteo Celular Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) esencialmente según se describe en el manual técnico. En resumen, se colocaron 5.000 a 10.000 células / pocillo en placas de 96 pocillos, se dejó que se unieran y se incubaron con diferentes concentraciones de RIT por 72 horas a un volumen final de 0,2 ml, después de lo cual se agregaron 10 µl del reactivo CCK-8 a cada pocillo. Se incubaron las placas a 37°C hasta que los pocillos con la máxima absorbancia a 450 nm alcanzaron los valores de alrededor de 1 OD. Se estandarizaron los valores entre los controles con ciclohexamida (10 µg/ml) y tampón (albúmina sérica humana 0,2% en PBS) y se ajustaron a una ecuación sigmoidea de 4 parámetros estándar con una pendiente variable usando el programa GraphPad PRISM para obtener la concentración de inmunotoxina en la cual se registró muerte celular de un 50% (EC₅₀).

Se realizó el ensayo de viabilidad de células de pacientes con mesotelioma según se describe. En resumen, se obtuvieron células del líquido pleural o ascítico de pacientes con mesotelioma y se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en una placa de 24 pocillos con diversas concentraciones de las RIT SS1P, SS1-LR, BL22 (anti-CD22/PE38) como control negativo, y HB21 (receptor anti-transferrina/PE3) como control positivo. Se incubaron las células por 96 horas, se fijaron, y tiñeron con tintura cristal violeta. Se determinó la intensidad del color de cada pocillo mediante un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA) a una longitud de onda

de 595 nm. Cada valor fue determinado por triplicado. Se realizó un análisis estadístico de los datos resultantes por ANOVA usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Ensayo antitumoral de xenoinjerto de ratón

Se inyectaron 24 ratones hembra, sin pelaje, por vía subcutánea en el costado con células A431/K5 el día 0 según se describió previamente (Zhang Y, *Clin Cancer Res.*, 12(15):4695-701 (2006)). Se midió el volumen tumoral regularmente mediante calibre durante las 6 semanas siguientes. Cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó $\sim 100 \text{ mm}^3$, 5 días después del implante, se dividieron los ratones en cuatro grupos de seis y se inyectaron QODX3 con 0,2 ml de MSA 0,2% en PBS (vehículo solo) o vehículo que contenía ya sea SS1P (0,3 mg/kg) o bien SS1-LR (6,0 o 15 mg/kg). Se sacrificaron los ratones si sus tumores excedían 1000 mm^3 o al final del experimento. Los animales fueron tratados de acuerdo a las pautas de National Institutes of Health aprobadas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Nacional del Cáncer.

Ensayo de internalización de RIT

Se plaquearon células A431/K5 (10^6 /pocillo) en una placa de 6 pocillos (10 cm^2 /célula) y se dejaron en incubación durante toda la noche. Al día siguiente, se reemplazó el medio en cada pocillo por 1 ml de medio fresco que contenía 1 μg de la RIT que iba a ser evaluada. Se incubaron las células a 37°C durante diversos intervalos de tiempo, después de lo cual se enjuagó brevemente el pocillo con 2 ml de PBS frío, 1 ml de tampón para “stripping” frío (1 mg/ml de BSA en glicina 0,2 M, pH 2.5), y nuevamente con 2 ml de PBS frío. Posteriormente, se lisaron las células con 200 μl de tampón RIPA (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1%, deoxicolato de Na 0,5%, SDS 0,1%, Tris-Cl 59 mM, pH 8.0) que contenía un cocktail de inhibidor de proteasa (Sigma, St. Louis, MO). Se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE y Western blot no reductora con Tris-glicina usando un anticuerpo policlonal anti-PE38 de conejo.

Citotoxicidad variable del SS1-LR

Experimentos iniciales con SS1-LR demostraron que éste tenía una citotoxicidad sumamente variable en relación con el SS1P en la selección de líneas celulares que

expresaban mesotelina, fluctuando de más de 4 veces más activo a 20 veces menos activo. Sin embargo, la tendencia general fue hacia una molécula menos activa. El SS1-LR fue más de un 20% menos activo en relación con el SS1P en 5 de las 8 líneas celulares sometidas a prueba, y solo más de un 20% más activo en una sola línea celular. Esta tendencia fue extremadamente diferente de la versión anti-CD22 de la molécula LR, HA22-LR, que habitualmente demostró una citotoxicidad similar o mayor en ambas líneas celulares y células de pacientes (Weldon JE, *Blood.*, 113(16): 3792-800 (2009)). Estas observaciones indican que hay una diferencia intrínseca entre la vía de intoxicación de la PE en las células epiteliales que expresan mesotelina y en las células B que expresan CD22.

Tabla 1. Resumen de la citotoxicidad del SS1-LR

	EC ₅₀ (ng/ml)		
Línea celular	SS1P	SS1-LR	Actividad relativa
L55	5,32	4,66	1,14
NCI-H322M	0,63	1,80	0,35
HAY	4,79	1,05	4,56
KB31	0,47	9,34	0,05
M30	2,56	3,23	0,79
A431/K5	0,17	0,72	0,24
OVACR-8	1,40	4,13	0,34
A1847	4,59	4,70	0,98

Actividad *in vitro* del SS1-LR

La inmunotoxina SS1P (Figura 1A) está compuesta por Fv de SS1 anti-mesotelina de dos cadenas estabilizado por disulfuro, unido a PE38 (Chowdhury PS et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95: 669-674 (1998), Chowdhury PS y Pastan I., *Nat Biotechnol.*, 17: 568-572 (1999), Reiter Y y Pastan I., *Clin. Cancer Res.*, 2: 245-252 (1996)). Se introdujo la mutación LR (Weldon JE, *Blood.*, 113(16): 3792-800 (2009); PE Δ251-273 & Δ285-394) en el SS1P para crear la variante SS1-LR (Figura 1B) y se evaluó su actividad en comparación con el SS1P contras varias líneas celulares que expresaban mesotelina *in vitro*. La Figura 2 muestra ensayos de citotoxicidad representativos de ocho líneas celulares diferentes.

La línea celular de cáncer pulmonar L55 (A) mostró una sensibilidad similar a ambas RIT. En contraste, la línea celular de cáncer pulmonar NCI-H322M (Pal LH et al., *Nat Med.*, 2(3): 350-3 (1996)) fue aproximadamente 3 veces menos sensible al SS1-LR que el SS1P. La línea celular de mesotelioma HAY (G) fue más de 4 veces más sensible al SS1-LR que al SS1P, pero la línea de mesotelioma M30 (D) fue alrededor de un 20% menos sensible que el SS1P-LR. La línea celular A431/K5 (H), una línea epitelial transfectada establemente con mesotelina (Chowdhury PS et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95: 669-674 (1998), Chang K and Pastan I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 136-140 (1996)), fue alrededor de 4 veces menos sensible al SS1-LR en comparación con el SS1P. Además, la línea de cáncer cervical KB31 (C) es susceptible a ser destruida por el SS1P, pero su EC_{50} es 20 veces menor que el SS1-LR. Asimismo, se evaluaron las sensibilidades de las líneas de cáncer ovárico A1847 (F) y OVCAR-8 (E) al SS1-LR. El SS1-LR mostró una EC_{50} similar al SS1P en la línea celular A1847, pero una EC_{50} reducida 2 veces en la línea OVCAR-8. La Tabla 1 resume estos datos y presenta los valores de EC_{50} relativos comparando el SS1P y el SS1-LR. La actividad del SS1-LR en relación con el SS1P varió ampliamente entre las diferentes líneas celulares.

Al analizar los datos, nos dimos cuenta que el SS1-LR no redujo completamente la viabilidad de muchas de las líneas celulares que se evaluaron (NCI-H322M, KB31, M30, OVCAR-8, y A1847) a niveles control, según lo definieron las células tratadas con 10 μ g/ml de ciclohexamida. Esto indicó que una subpoblación de células puede ser sensible al SS1P, pero resistente al SS1-LR. Evaluamos esta posibilidad incubando células OVCAR-8 y A 1847 durante 4 días con 10 ng/ml de SS1-LR e intentando cultivar cualquier célula sobreviviente. No se observó ningún crecimiento celular después del tratamiento con RIT. Concluimos que, si bien no se obtuvo una inhibición metabólica completa mediante nuestro ensayo, no hay subpoblación de estas líneas celulares que sea resistente al SS1-LR.

Actividad *in vivo* del SS1-LR

A continuación, evaluamos la eficacia de SS1-LR usando un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón. De las líneas celulares que sometimos a pruebas *in vitro*, solo la

A431/K5 creció de manera regular en nuestro modelo de xenoinjerto. Se sometieron a tratamiento intravenoso ratones sin pelaje con tumores de xenoinjerto de A431/K5 que promediaban -100 mm^3 QODX3 (día por medio para tres dosis) con SS1-LR en dosis de 6,0 o 15 mg/kg. Para comparar, se sometieron a tratamiento intravenoso grupos adicionales QODX3 ya sea con tampón (HSA 0,2% en PBS) o bien con SS1P 0,3 mg/kg, la dosis tolerada máxima de SS1P conforme a este esquema de dosificación. Se midió el tamaño del tumor de cada ratón en forma regular durante 22 días después del implante (Figura 3).

Los tumores de ratones tratados con PBS crecieron rápidamente a un tamaño promedio superior a 1000 mm^3 el día 14 después del implante. Los ratones tratados los días 5, 7 y 9 con 0,3 mg/kg de SS1P mostraron regresiones tumorales que llevaron el tamaño tumoral promedio a un mínimo de aproximadamente 53 mm^3 el día 12. Alrededor del día 20, todos los tumores habían reanudado un rápido crecimiento. La dosis de 6,0 mg/kg de SS1-LR fue levemente menos potente que 0,3 mg/kg de SS1P. Los tumores en los ratones tratados con 6,0 mg/kg de SS1-LR alcanzaron un tamaño mínimo promedio de 92 mm^3 los días 7 y 9, y todos reanudaron un rápido crecimiento alrededor del día 18. La dosis de 15 mg/kg de SS1-LR demostró una actividad antitumoral significativamente mejor que 0,3 mg/kg de SS1P. Los tumores en los ratones tratados con 15 mg/kg de SS1-LR regresaron a un tamaño mínimo promedio de 17 mm^3 . El día 22, cuatro de los seis tumores reanudaron el crecimiento, un tumor no experimentó cambios a 100 mm^3 desde el día 18, y un tumor fue indetectable después del día 15. Si bien el SS1-LR es alrededor de 20 veces menos activo que el SS1P en este modelo, su baja toxicidad no específica nos permite tratar ratones con dosis altas y lograr un efecto antitumoral superior.

Procesamiento de RIT internalizadas

Las diferencias en el tráfico y procesamiento intracelular entre el SS1P y el SS1-LR podrían explicar la variación de actividad que observamos entre las dos RIT. Para probar esta hipótesis, examinamos la internalización y procesamiento del SS1P y del SS1-LR en las células A431/K5 mediante inmunotransferencia ("Western blot") (Figura 4). Se escogieron células A431/K5, porque expresan niveles altos de mesotelina

(alrededor de 106 sitios/célula) e internalizan grandes cantidades de RIT para la visualización. Realizamos una SOS-PAGE e inmunotransferencia (“Western blot”) no reductora en lisados de células completas de células A431/K5 tratadas con incubación continua de 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ de ya sea SS1P o bien SS1-LR durante diversos intervalos de tiempo. La Figura 4A muestra un curso de tiempo del tratamiento con SS1P, si bien la figura 4B muestra un curso de tiempo del tratamiento con SS1-LR.

Tal como se esperaba, las células A431/K5 tratadas con ya sea SS1P o bien SS1-LR tienen bandas prominentes en posiciones que indican longitud completa (62 kDa y 50 kDa, respectivamente) y formas reducidas (51 kDa y 39 kDa, respectivamente) de las dos RIT. Ambas RIT contienen tres enlaces disulfuro en la región de Fv: un enlace intracadena en cada uno en los fragmentos VH y VL, y un enlace intracadena entre VH y VL (Figura 1). El SS1P contiene un enlace disulfuro adicional en el dominio II entre los residuos de cisteína que flanquean el sitio de corte de furina (Cys²⁶⁵ y Cys²⁸⁷). El estado de oxidación del enlace disulfuro adicional en el SS1P parece cambiar la migración del SS1P en SOS-PAGE, causando el doblete observado (Figura 4A, Reducido). Estas bandas se contraen en una sola banda cuando se tratan con un agente reductor (no se muestran datos).

Esperábamos también observar bandas correspondientes a los fragmentos de corte por furina C-terminales del SS1P y del SS1-LR (34 kDa y 24 kDa, respectivamente). Los lisados de células tratadas con SS1P muestran una banda prominente cerca de 34 kDa, lo cual indica un fragmento de corte por furina. En contraste, los lisados de células tratadas con SS1-LR muestran solo una banda débil correspondiente a 24 kDa. Se cuantificó la intensidad de cada banda con el software ImageQuant (GE Healthcare). La Figura 4C muestra el porcentaje de intensidad de banda total del fragmento cortado por furina en cada punto de tiempo. El SS1P cortado por furina alcanza un máximo de levemente más de un 30% de la suma de la intensidad de todas las bandas, si bien el SS1-LR alcanza un máximo de un 6% de la intensidad total. Hay una diferencia de más de 5 veces entre las proporciones de SS1P cortado y SS1-LR cortado en cada punto de tiempo, lo cual indica que el SS1-LR puede ser procesado por furina en forma menos eficiente que el SS1P.

Mutantes de linker flexible

Dado que nuestros datos indican que el SS1-LR es procesado por la furina en forma menos eficiente que el SS1P, tratamos de aumentar la actividad del SS1-LR aumentando su eficiencia de corte por furina. Diseñamos algunos mutantes para explorar si los cambios en el sitio de corte de furina podrían aumentar o no la actividad del SS1-LR mejorando la eficiencia del corte intracelular por furina. Nuestra estrategia fue aumentar la flexibilidad del sitio de corte de furina y, de este modo, su accesibilidad a la furina, mediante la adición de linkers Gly/Ser cortos no estructurados. El SS1-LR/GGS (Figura 1B) incluye un linker Gly-Gly-Ser en el extremo C terminal del sitio de corte de furina de 11 residuos, y tiene una actividad aumentada en las líneas celulares de NCIH322M y KB31 (Figura 5). El hecho de aumentar la longitud del linker (SS1-LR/GGSx2, Figura 1B) no aumenta la actividad más (no se muestran datos). La duplicación del sitio de corte de furina con regiones linker adicionales (SS1-2xFurina; Figura 1 B) tampoco aumenta la actividad más allá de la del SS1-LR/GGS (no se muestran datos). A diferencia del SS1-LR, todos los mutantes de linker extendidos demuestran una inhibición metabólica completa equivalente al control ciclohexamida. En forma adicional, para confirmar la importancia del corte por furina preparamos el mutante SS1-LR/GGS R279G, que incluye la mutación R279G que hace que la furina sea incapaz de cortar el sitio. Este mutante fue completamente inactivo contra las células KB31 y NCI-H322M (Figura 5), demostrando que para tener actividad necesita del corte por furina.

Luego probamos nuestra hipótesis de que el linker GGS aumentaba la eficiencia de corte por furina del SS1-LR. No obstante, el análisis de inmunotransferencia ("Western blot") de células A431/K5 con SS1-LR/GGS no mostró mejoramiento en la proporción de RIT cortada en relación con la RIT total (no se muestran datos). Asimismo, el corte por furina *in vitro* del SS1-LT/GGS no mostró mejoramiento en la velocidad de corte por furina (no se muestran datos). Estos resultados indican que una mejor citotoxicidad del SS1-LR/GGS no se debe a un aumento del corte por furina, sino que en cambio, es el resultado de un mecanismo diferente. Entre las posibles

explicaciones se encuentran el aumento de translocación de la toxina durante el tráfico intracelular.

Actividad en células de pacientes

Si bien este estudio estaba en curso, se diseñó una serie de 8 mutaciones de punto en el dominio III para reducir la inmunogenicidad de la PE en pacientes con RIT eliminando los epítomos de células B conocidos (Onda M et al., presentado para publicación a *PNAS*.). Estas mutaciones (D406A, R432G, R467 A, R490A, R513A, E548S, Q592A, y K590S) no influyen en la actividad de las RIT, sino que en lugar de ello reducen la inmunogenicidad de la proteína. Incorporamos estas 8 mutaciones en el SS1-LR/GGS, fabricando una nueva variante denominada SS1-LR/GGS/8M, y sometimos a prueba su citotoxicidad contra células primarias tomadas del líquido pleural o ascitis de pacientes con mesotelioma. El líquido tomado de los pacientes contiene una mezcla de células, de las cuales no todas son malignas, y no expresan de manera uniforme mesotelina. En consecuencia, el ensayo proporciona una buena evaluación de la actividad relativa, pero es solo una estimación aproximada de la citotoxicidad absoluta. Las células fueron tratadas en un pasaje previo con diversas concentraciones de SS1P o SS1-LR/GGS/8M y se evaluó la viabilidad después de cuatro días mediante un ensayo con cristal violeta según lo descrito. De varias células de pacientes que se evaluaron en cuanto a respuesta al SS1P, dos (NCI-M-02 y NCI-M-03) mostraron una buena respuesta al tratamiento (>65% de disminución en la viabilidad a un nivel de dosis de 100 ng/ml). Evaluamos la actividad del SS1-LR/GGS/8M en estas dos poblaciones y la comparamos con la actividad del SS1P. Los datos se presentan en la Figura 6 como valores fraccionales del valor del control no tratado.

Ambas células de pacientes NCI-M-02 y NCI-M-03 fueron sensibles al tratamiento con SS1P o SS1-LR/GGS/8M, mostrando una disminución superior a un 60% en la viabilidad en relación con el control no tratado en dosis de 100 ng/ml o menos. NCI-M-02 y NCI-M-03 fueron particularmente sensibles a SS1-LR/GGS/8M en los niveles de dosis de 1,0 y 10 ng/ml, demostrando una citotoxicidad significativamente más alta cuando se le comparó con el SS1P en estas concentraciones ($p < 0,05$). Como

controles, las células de los pacientes fueron tratadas también con las RIT BL22 y HB21 (no se muestran datos). La BL22, que es dirigida al marcador específico de células B CD22, no tuvo efecto en la viabilidad de la población celular en una dosis de 100 ng/ml. La HB21, que es dirigida al receptor de transferrina omnipresente y que se sabe es extremadamente activo en cerca de todas las células, redujo la viabilidad de ambas líneas celulares en cerca de un 90% en una dosis de 10 ng/ml. En general, los datos muestran que el SS1-LR/GGS/8M tuvo una citotoxicidad similar a o mejor que el SS1P en las dos poblaciones celulares diferentes de pacientes. Concluimos que las dos inmunotoxinas anti-mesotelina, si bien no se comportan idénticamente, tienen una actividad citotóxica comparable.

Ejemplo 2

Otro informe extenso sobre la construcción, evaluación y contraste del SS1-LR/GGS/8M, una variante del SS1P con propiedades terapéuticas mejoradas. Según se indicó anteriormente, el SS1-LR/GGS/8M incorpora mutaciones que previamente se ha mostrado mejorar las RIT, como también una nueva mutación que aumenta su actividad. El SS1-LR es una variante truncada del SS1P que contiene el fragmento catalítico de PE unido al Fv de SS1 por el sitio de corte por furina de PE de 11 residuos. Se evaluó la citotoxicidad del SS1-LR en siete líneas celulares y se encontró que era sustancialmente menor que el SS1P. Otro análisis del SS1-LR en células cultivadas indicó que éste era procesado en forma deficiente por la furina durante la vía de intoxicación. Para mejorar el corte por furina, introdujimos un linker de 3 residuos en SS1-LR, creando el SS1-LR/GGS, que fue significativamente más activo en las líneas celulares, pero que no mostró un aumento del corte por furina. Introdujimos 8 mutaciones puntuales en el fragmento catalítico de SS1-LR/GGS, que se ha mostrado disminuye la inmunogenicidad de la RIT eliminando los epítomos de células B. Esta nueva RIT, SS1-LR/GGS/8M, muestra en la presente una excelente actividad antitumoral, una baja toxicidad no específica en roedores, y una reactividad reducida con suero humano anti-SS1P. Además, las células primarias de pacientes con mesotelioma muestran mayores respuestas al SS1-LR/GGS/8M en relación con el

SS1P. El SS1-LR/GGS/8M es un candidato terapéutico superior para el desarrollo clínico debido a su baja antigenicidad, baja toxicidad no específica y alta actividad.

Se usaron varias líneas celulares derivadas de humanos positivas para mesotelina. Estas células eran de origen general y fueron cultivadas según se indica en el Ejemplo 1.

Ensayos de citotoxicidad

Se midió la viabilidad de las líneas celulares tratadas con inmunotoxinas usando el ensayo WST-8 Kit de Conteo Celular Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). Se colocaron células (2.000 células / pocillo) en placas de 96 pocillos, se dejó que se adhirieran y se incubaron con diferentes concentraciones de RIT por 72 horas a un volumen final de 0,2 ml. Al final del periodo de incubación, se agregaron 10 µl del reactivo CCK-8 a cada pocillo y se incubaron las placas a 37°C hasta que los pocillos con la máxima absorbancia a 450 nm alcanzaron los valores de ~ 1 OD. Se estandarizaron los valores entre los controles con ciclohexamida (10 µg/ml) y tampón (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca y Mg (D-PBS; Quelite Biológica, Inc., Gaithersburg, MD) que contenía albúmina sérica humana (HSA) 0,2%), luego se ajustaron a una ecuación sigmoidea con pendientes variables para la meseta, línea base y pendiente ("Hill slope") usando el software GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Se usó la ecuación posteriormente para interpolar la concentración de RIT que redujo la viabilidad celular al nivel de 50% (EC₅₀).

Se cultivaron las células de pacientes con mesotelioma y se les evaluó con respecto a sus respuestas al SS1P y al SS1-LR/GGS/8M esencialmente según se describe (Xiang X, et al., PLoS One 2011;6:e14640.). Se usaron D-PBS y 10 ng/ml de HB21 (receptor de antitransferrina/PE40) como controles negativo y positivo para la muerte celular. Se evaluó cada condición por triplicado. Se realizó un análisis estadístico de los datos resultantes por ANOVA usando el software GraphPad Prism.

Ensayo antitumoral de xenoinjerto de ratón

Se inyectaron veintiocho ratones sin pelaje hembra por vía subcutánea en el costado con 5×10^6 células L55 en 0,2 ml de RPMI con 4 mg/ml de matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) el día 0. Se midió el volumen tumoral regularmente

mediante calibre durante los 30 días siguientes. Siete días después del implante (tumor promedio de $\sim 100 \text{ mm}^3$), se dividieron los ratones en cuatro grupos iguales y se inyectaron por vía intravenosa los días 7, 9 y 12 con 0,2 ml de HSA 0,2% en D-PBS (vehículo) o vehículo que contenía ya sea SS1P (0,4 mg/kg) o bien SS1-LR/GGS/8M (0,4 o 2,5 mg/kg). Este experimento y todos los experimentos con animales posteriores fueron tratados de acuerdo a las pautas de National Institutes of Health aprobadas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Nacional del Cáncer.

Farmacocinética sérica de ratón

Se inyectaron grupos de nueve ratones Balb/c hembra por vía intravenosa con 10 μg de SS1P o SS1-LR/GGS/8M en 0,2 ml de D-PBS con HSA 0,2%. Se desangraron grupos de tres ratones en intervalos de tiempo de 2 y 20, 5 y 30, o 10 y 60 minutos. Se analizaron los sueros mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) según se describió previamente (Bang S, et al., *Clin Cancer Res* 2005;11:1545-50.25)).

Ensayo de extravasación capilar de rata

Se usó un modelo de rata descrito previamente de síndrome de extravasación capilar inducida por RIT (Siegall CB, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9514-8.) para evaluar la toxicidad no específica del SS1-LR/GGS/8M. En resumen, se inyectaron ratas (Harlan-Sprague-Dawley) nu/nu (atímicas) Wistar Furth and Rowett hembra de seis a 8 semanas de edad por vía intravenosa con D-PBS, SS1P (0,2 o 0,3 mg/kg) o SS1-LR/GGS/8M (6 o 12 mg/kg). Después de 24 horas, se sacrificaron las ratas mediante exposición a CO_2 . Se recogió el líquido del hidrotórax de los animales sacrificados colocando el cuerpo decúbiteo dorsal, retirando la pared de la región torácica ventral, y aspirando el líquido mediante una jeringa de 3 ml y una aguja de calibre 27,5. Se sacaron los pulmones de varias ratas, se fijaron durante 3 días en formalina 10%, se seccionaron y se tiñeron.

Se realizaron los ensayos de internalización de RIT esencialmente según se describió anteriormente con las muestras que estaban siendo analizadas mediante inmunotransferencia ("Western blot") no reductora usando un anticuerpo policlonal anti-PE38 de conejo.

Ensayo de antigenicidad

Se analizó la unión del SS1P o SS1-LR/GGS/8M a anticuerpos en sueros de pacientes esencialmente según se describe (Onda M, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:5742-7), exceptuando el hecho de que se usaron CD22-rFc y HA22 para la detección de anticuerpos específicos de PE mediante ELISA.

Resultados

Actividad *in vitro* del SS1-LR

La inmunotoxina SS1P (Figura 1) es el Fv de SS1 anti-mesotelina de dos cadenas estabilizado por disulfuro unido a PE38. Introdujimos la mutación LR ((Weldon JE, et al. *Blood* 2009;113:3792-800); PE Δ251-273 & Δ285-394) en el SS1P para crear el SS1-LR y evaluamos su actividad en siete líneas celulares que expresan mesotelina *in vitro*. La Tabla 2 resume los datos de por lo menos 3 experimentos de citotoxicidad separados como los valores de EC₅₀ promedio y el error estándar de la media. En comparación con el SS1P, el SS1-LR fue más activo en la línea celular HAY, pero menos activo en las líneas restantes. La actividad del SS1-LR varió ampliamente entre las diferentes líneas celulares, pero fue menos activo en las líneas celulares de cáncer ovárico.

Tabla 2

Línea celular	Cáncer de origen	EC ₅₀ ± SEM (ng/ml)				
		SS1P	SS1-LR	SS1-LR/GGS	SS1-LR/GGS/8M	SS1-LR/GGS R279G
HAY	Mesotelioma	2,24 ± 0,21	0,52 ± 0,07	0,10 ± 0,04	0,22 ± 0,02	>1000
M30	Mesotelioma	0,57 ± 0,07	3,70 ± 0,85	0,93 ± 0,18	1,46 ± 0,20	>1000
NCI-H322M	Adenocarcinoma pulmonar	0,30 ± 0,07	1,65 ± 0,23	0,18 ± 0,05	0,42 ± 0,09	>1000
L55	Adenocarcinoma pulmonar	2,89 ± 0,43	6,67 ± 1,27	1,08 ± 0,17	1,73 ± 0,31	>1000
OVCAR-8	Carcinoma ovárico	0,84 ± 0,21	49,1 ± 37,9	2,84 ± 1,43	14,4 ± 8,78	>1000
A1847	Carcinoma ovárico	1,01 ± 0,21	27,0 ± 8,70	2,73 ± 0,79	17,7 ± 7,13	>1000

		EC ₅₀ ± SEM (ng/ml)				
Línea celular	Cáncer de origen	SS1P	SS1-LR	SS1-LR/GGS	SS1-LR/GGS/8M	SS1-LR/GGS R279G
A431/K5	Carcinoma epidermoide	0,044 ± 0,005	0,561 ± 0,198	0,199 ± 0,033	0,194 ± 0,038	15,12 ± 3,625

SS1-LR/GGS/8M

La inmunogenicidad sigue siendo un problema importante para las RIT a base de PE (Weldon JE, et al., *FEBS J.* 2011 Dec;278(23): 4683-700). Si bien el trabajo que comparó HA22-LR con HA22 (Hansen JK, et al., *J Immunother* 2010;33:297-304)) nos lleva a prever que el SS1-LR es menos inmunogénico que el SS1P, los elementos restantes de PE, no obstante, producirán rápidamente anticuerpos neutralizantes. Para remover los epítomos de células B inmunogénicos en la PE, se ha diseñado recientemente una serie de ocho mutaciones puntuales en el dominio III (Onda M, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:5742-7.). Estas mutaciones (D406A, R432G, R467A, R490A, R513A, E548S, Q592A, y K590S) reducen considerablemente la inmunogenicidad de HA22-LR en los ratones, pero no disminuyen en gran manera su citotoxicidad. Incorporamos las mutaciones en el SS1-LR/GGS, fabricando una nueva variante denominada SS1-LR/GGS/8M, y sometimos a prueba la RIT contra siete líneas celulares que expresaban mesotelina. En la Tabla 2 se informan los valores de EC₅₀ de estos experimentos. El SS1-LR/GGS/8M es más activo que el SS1-LR y en ocasiones es más activo que el SS1P (HAY, L55), pero es menos activo que el SS1-LR/GGS. La disminución de actividad se aprecia especialmente en las líneas de cáncer ovárico.

Toxicidad no específica

En un trabajo previo con la RIT HA22 anti-CD22, descubrimos que una sola dosis intravenosa de 2 mg/kg de HA22 fue letal para los ratones, en tanto que una dosis de 20 mg/kg de HA22-LR no mostró toxicidad (Weldon JE, et al., *Blood* 2009;113:3792-800). Desde entonces, hemos administrado dosis únicas de HA22-LR de hasta 45 mg/kg a ratones sin causar la muerte (observaciones no publicadas, datos no mostrados), y prevemos un comportamiento similar del SS1-LR y sus variantes.

Experimentos previos colocaron la LD₅₀ intravenosa de dosis única de SS1P en 1,0 mg/kg en ratones Balb/C (Filpula D, et al., *Bioconjug Chem* 2007;18:773-84) y 0,75 mg/kg en ratones suizos NIH (Onda M., et al., *Cancer Res* 2001;61:5070-7). Usando un programa de dosificación QODx3 (administración tres veces al día por medio) similar al programa clínico, los ratones han tolerado una dosis máxima de 0,4 mg/kg de SS1P (observaciones no publicadas, datos no mostrados), pero los ratones a los que se les administró SS1-LR han recibido dosis de hasta 15 mg/kg QODx3 sin toxicidad (no se muestran datos).

Si bien la disminución de la toxicidad no específica de las RIT a base de LR en los ratones intriga, puede que no sea importante para las toxicidades principales observadas en los estudios clínicos. La toxicidad no específica de las RIT en los ratones es el resultado del daño hepático (Weldon JE, et al., *Blood* 2009;113: 3792-800; Onda M, et al., *J Immunol.* 2000;165: 7150-6), lo que no se observa comúnmente en los pacientes. Un modelo animal más pertinente de toxicidad no específica es un síndrome de extravasación capilar inducido por RIT en ratas (Siegall CB, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 9514-8., Siegall CB, et al., *Clin Cancer Res* 1997;3: 339-45). El síndrome de extravasación capilar, en el cual se fuga líquido de los vasos capilares en el espacio intersticial, es una toxicidad común observada en los estudios clínicos de RIT a base de PE. Usando este modelo, observamos que las ratas tratadas por vía intravenosa con 2 mg/kg de SS1P parecieron enfermarse después de 24 horas; ellas tienen dificultades respiratorias y acumulación de líquido en su cavidad torácica (Figura 7A). El aumentar la dosis de SS1P a 3 mg/kg aumentó el volumen de líquido torácico. En contraste, las ratas tratadas con D-PBS o SS1-LR/GGS/8M nos mostraron signos de enfermedad y no retuvieron líquido. Se administraron dosis de 6 mg/kg y 12 mg/kg de SS1-LR/GGS/8M sin un efecto observable. Cuando se fijaron y tiñeron los pulmones de ratas tratados con D-BPS, SS1P y SS1-LR/GGS/8M, los tratados con D-PBS o SS1-LR/GGS/8M parecieron estar normales, si bien los de las ratas tratadas con SS1P mostraron signos de daño severo (Figura 7B). Si bien no se ha sometido a pruebas clínicas la molécula a base de LR, esta observación refuerza la proposición de que las RIT a base de LR pueden tener una toxicidad menor en los pacientes.

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

A continuación, evaluamos la eficacia del SS1-LR/GGS/8M *in vivo* con un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón usando la línea celular de cáncer pulmonar L55. Grupos de siete ratones sin pelaje con tumores que promediaban $\sim 100 \text{ mm}^3$ fueron tratados por vía intravenosa los días 7, 9 y 12 con SS1-LR/GGS/8M e dosis de 0,4 y 2,5 mg/kg. Para comparar, se trataron grupos adicionales por vía intravenosa de acuerdo al mismo programa con vehículo (HSA 0,2% en D-PBS) o 0,4 mg/kg de SS1P, la dosis tolerada máxima de SS1P en virtud de este programa de dosificación. Se midió el tamaño del tumor de cada ratón en forma regular durante 30 días después del implante (Figura 7C).

Los tumores de los ratones tratados con vehículo crecieron a un tamaño promedio de aproximadamente 500 mm^3 el día 16 después del implante. Los ratones tratados con 0,4 mg/kg de SS1P mostraron una breve demora en el crecimiento tumoral que se requería hasta el día 23 después del implante para que los tumores alcanzaran un tamaño aproximado de 500 mm^3 . Observamos una respuesta casi idéntica en ratones tratados con 0,4 mg/kg de SS1-LR/GGS/8M, lo cual indica una paridad entre SS1P y SS1-LR/GGS/8M en este modelo. Si bien no se puede administrar SS1P a ratones en este programa en dosis más altas que 0,4 mg/kg debido a su toxicidad no específica, se puede administrar SS1-LR/GGS/8M a ratones en dosis mucho más altas sin efectos negativos. En este modelo tumoral se sometió a prueba una dosis ~ 6 veces más alta de SS1-LR/GGS/8M (2,5 mg/kg). Observamos una regresión tumoral importante ($p < 0,01$ usando una prueba t bilateral pareada) en este grupo de ratones, cuyos tumores alcanzaron un tamaño mínimo de $\sim 73 \text{ mm}^3$ el día 9. Este grupo de ratones experimentó también inhibición del crecimiento tumoral, alcanzando un tamaño de alrededor de 500 mm^3 el día 30 después del implante.

Si bien el SS1-LR/GGS/8M tuvo una actividad equivalente al SS1P en el modelo tumoral de xenoinjerto L55 de ratón, éste demostró una mayor actividad en relación con el SS1P en células L55 *in vitro*. Esta discrepancia en la actividad puede ser explicada por una diferencia en la vida media sérica del ratón entre las dos moléculas. Un trabajo previo que comparó la vida media de HA22-LR ($\sim 51 \text{ kDa}$) con HA22 ($\sim 63 \text{ kDa}$) en

ratones (Weldon JE, et al., *Blood* 2009;113:3792-800.) mostró que HA22-LR tenía una vida media casi 2 veces más corta que HA22 (7,8 y 14,6 minutos, respectivamente). Postulamos que esta diferencia se debió al aumento de la filtración renal de la molécula más pequeña, y prevemos un resultado similar al comparar el SS1-LR/GGS/8M (~50 kDa) con el SS1P (~63 kDa). Un análisis de las muestras séricas tomadas de ratones inyectados con SS1-LR/GGS/8M mostró una vida media de 13 minutos en comparación con una vida media de 19 minutos para el SS1P (Figura 7D). Concluimos que la diferencia en la vida media entre el SS1-LR/GGS/8M y el SS1P explica la discrepancia en la actividad relativa entre las dos moléculas *in vitro* e *in vivo*.

Antigenicidad del SS1-LR/GGS/8M

En base a estudios previos con la RIT HA22 (Onda M, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:5742-7), previmos que las mutaciones en el SS1-LR/GGS/8M removerían los epítomos de células B del SS1P. Con el objeto de evaluar esta proposición, comparamos la reactividad del SS1P y del SS1-LR/GGS/8M con suero de cinco pacientes que habían desarrollado anticuerpos neutralizantes en respuesta al tratamiento con SS1P. Se mezcló inicialmente el suero con SS1P o bien SS1-LR/GGS/8M. Posteriormente, se detectaron anticuerpos específicos para PE32 no ligados en el suero usando un ICC-ELISA (Onda M, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:5742-7). A partir de estos datos, se determinaron las concentraciones de SS1P y SS1-LR/GGS/8M en las cuales se redujo la señal de ELISA en un 50% (IC₅₀). Según se informó previamente (Onda M, et al., *J Immunol* 2006;177:8822-34), los valores de IC₅₀ están correlacionados con la afinidad de la interacción anticuerpo / antígeno. Los valores de IC₅₀ del SS1P en relación con el SS1-LR/GGS/8M se grafican como porcentajes en la Figura 8. Para todos los sueros de los pacientes, las relaciones de valores IC₅₀ entre SS1P y SS1-LR/GGS/8M fueron sustancialmente inferiores a 10%, lo cual indica que la fracción más importante de los anticuerpos reactivos al SS1P en los sueros no fue reactiva con el SS1-LR/GGS/8M.

Actividad en células de pacientes

Para complementar nuestra evaluación del SS1-LR/GGS/8M en líneas celulares *in vitro* e *in vivo*, sometimos también a prueba su actividad contra las células primarias

obtenidas del líquido pleural o ascitis de pacientes con mesotelioma y mantuvimos en cultivo por varios pasajes. Dado que el líquido tomado de pacientes contiene una mezcla de células, el ensayo proporciona una buena evaluación de la actividad relativa, pero es solo una estimación aproximada de la citotoxicidad absoluta. Se trataron células de dos pacientes adicionales con diversas concentraciones de SS1P, y se evaluó su viabilidad después de cuatro días usando un ensayo con cristal violeta. La NCI-M-16 de células de pacientes con mesotelioma del pasaje previo, y la NCI-M-19 mostraron respuestas claras al tratamiento con SS1P (>75% de disminución de la viabilidad en el nivel de dosis de 100 ng/ml). Evaluamos la actividad del SS1-LR/GGS/8M en estas dos poblaciones de células derivadas de pacientes adicionales. En la Figura 9, se presentan los datos como valores fraccionales estandarizados entre los tratamientos control de D-PBS (100% viable) y 10 ng/ml del receptor antitransferrina/RIT HB21 de PE40 (0% viable). Todas las poblaciones de células de pacientes fueron extremadamente sensibles al tratamiento con SS1-LR/GGS/8M, demostrando una citotoxicidad significativamente mayor que el SS1P.

El SS1P es una inmunotoxina recombinante anti-mesotelina a base de exotoxina A de *Pseudomonas* que está actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento del mesotelioma, pero con el potencial de tratar una variedad de tumores sólidos que expresan mesotelina. En estudios clínicos, el SS1P ha alcanzado resultados modestos, pero alentadores. Sin embargo, su eficacia ha sido restringida por las toxicidades limitantes de la dosis y la rápida generación de anticuerpos neutralizantes en los pacientes. Aquí informamos que el SS1-LR/GGS/8M, una variante del SS1P con baja antigenicidad, tiene una excelente actividad, y una toxicidad no específica notablemente reducida en los roedores.

El SS1-LR/GGS/8M es una variante sumamente activa, menos tóxica y menos antigénica de la RIT SS1P anti-mesotelina a base de PE. Nuestra evaluación inicial del SSI-LR mostró una actividad sumamente variable, pero generalmente baja en una selección de líneas celulares que expresan mesotelina *in vitro* (Tablas 1 y 2). Si bien exploramos las razones para su baja actividad en relación con el SS1P, estudiamos la internalización y procesamiento del SS1-LR y descubrimos que la proporción de SS1-

LR cortado por furina fue mucho más baja que la del SS1P en células tratadas con los dos RIT. Esto indicó que la disminución del corte por furina podría estar limitando la actividad del SS1-LR, y diseñamos y produjimos varios mutantes para probar esta hipótesis. La adición de un linker Gly-Gly-Ser corto después del sitio de corte de furina no aumentó el corte por furina, pero sí aumentó la actividad del SS1-LR en las líneas celulares. Combinando el SS1-LR con el linker GGS y ocho mutaciones puntuales adicionales que se ha mostrado reducen la inmunogenicidad de la PE, generamos nuestra molécula final, SS1-LR/GGS/8M. En comparación con el SS1P, el SS1-LR/GGS/8M demostró una toxicidad no específica grandemente reducida en un modelo de extravasación capilar de rata, una mayor citotoxicidad contra las células de pacientes, y una reactividad reducida con anticuerpo en los sueros de pacientes. Experimentos iniciales con el SS1-LR demostraron una citotoxicidad variable en relación con el SS1P en líneas celulares. Sin embargo, la tendencia primaria fue hacia una molécula menos activa. El SS1-LR fue más activo en la línea celular HAY, y menos activo en las otras seis líneas. Esta tendencia es notoriamente diferente de la versión anti-CD22 de la molécula LR, HA22-LR, que demostró una citotoxicidad similar o mayor en la mayoría de las líneas celulares y las células de los pacientes (Weldon JE, et al., *Blood* 2009;113: 3792-800). Esta discrepancia indica que hay una diferencia intrínseca entre la vía de intoxicación de la PE dirigida a la mesotelina en las células epiteliales que expresan mesotelina y la PE dirigida a CD22 en las células B.

En lo que respecta a la actividad generalmente disminuida del SS1-LR en relación con el SS1P, una explicación posible para esta disparidad es una diferencia en la vía de intoxicación intracelular. La variante LR de la PE38 contiene extensas deleciones en el dominio II e Ib de la PE, y estas deleciones podrían tener un efecto negativo en la capacidad de la PE para transferirse al citosol. Nuestros experimentos para detectar PE de longitud completa y procesada en lisados de células tratadas con SS1P y SS1-LR mostraron una diferencia importante en la cantidad de RIT procesada por furina. Una fracción grande de la RIT total en las células tratadas con SS1-LR fue procesada, pero solo una pequeña fracción de la RIT total en las células tratadas con SS1-P, pero solo una fracción pequeña de la RIT total fue cortada en las células

tratadas con SS1-LR. Este resultado indicó que un corte por furina deficiente podría estar limitando la actividad del SS1-LR, y nos propusimos mejorar esta etapa de la vía de intoxicación de la PE.

Anexando un linker flexible al sitio de furina de SS1-LR, produjimos una RIT más activa, pero no pudimos demostrar un mayor corte por furina. La adición de un linker Gly-Gly-Ser corto (SS1-LR/GGS, Figura 1), un linker más largo (SS1-LR/GGSx2, Figura 1), una repetición del sitio de furina flanqueado por linkers Gly-Gly-Ser cortos (SS1-LR/2x Furina, Figura 1), otorgaron un modesto aumento de la citotoxicidad. No obstante, ninguna de estas moléculas aumentó la proporción de SS1-LR cortada por furina en células A431/K5 tratadas con SS1-LR o aumentó la velocidad del corte por furina *in vitro* (no se muestran los datos). Concluimos que la adición de un linker debe aumentar la citotoxicidad a través de otro mecanismo, tal vez relacionado con el tráfico intracelular o el aumento de estabilidad de la toxina, y seguiremos explorando estas posibilidades. Asimismo, nuestros experimentos demostraron la necesidad de un corte por furina en la citotoxicidad del SS1P. Una mutación puntual en el SS1-LR/GGS/8M que cambió una arginina esencial para el corte por glicina (SS1-LR R279G, Figura 1) produjo una proteína que no fue cortada por la furina. Esta RIT mostró una actividad extremadamente deficiente en todas las células, con una actividad insignificante en concentraciones de 120 µg/ml en seis de las siete líneas celulares sometidas a prueba. El mutante que no es posible de cortar muestra una EC₅₀ inferior a 1 µg/ml solo en las células A431/K5 (Tabla 2); no obstante, su actividad fue severamente dañada. Además, la expresión artificialmente alta de la mesotelina en esta línea celular puede que no sea representativa de las líneas que expresan mesotelina en forma natural. Se ha cuestionado recientemente la necesidad de corte por furina en la vía de intoxicación de la PE (Morlon-Guyot J, et al., *Infect Immun* 2009;77: 3090-9), pero existe mucha evidencia de que la furina desempeña un importante rol durante la intoxicación (Ornatowski W, et al.; *J Clin Invest* 2007;117: 3489-97, Shiryayev SA, et al., *J Biol Chem* 2007;282: 20847-53, Sarac MS, et al., *Infect Immun* 2002;70: 7136-9, Chiron MF, et al., *J Biol Chem* 1997;272: 31707-11, Gu M, et al., *Infect Immun* 1996;64: 524-7, Inocencio NM, et al., *J Biol Chem* 1994;269: 31831-5, y Moehring JM, et al., *J Biol Chem* 1993;18:

2590-4). En el caso presentado en la presente, la intoxicación de PE generalmente no ocurre sin un sitio adecuado para el procesamiento por la furina.

Nuestro laboratorio ha producido recientemente una RIT, HA22-LR-8M, que tiene una inmunogenicidad extremadamente baja debido a la eliminación de los epítomos de células B (Onda M, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108: 5742-7). El HA22-LR-8M contiene las deleciones de la variante LR de la PE y ocho mutaciones puntuales adicionales en el dominio III. Se colocaron estas mutaciones en el SS1P, generando el SS1-LR/GGS/8M. Dado que la mayor parte de la respuesta inmunológica a las RIT es dirigida en la PE, esperamos que el SS1-LR/GGS/8M presente una inmunogenicidad similarmente reducida. Para confirmar que el SS1-LR/GGS/8M remueve verdaderamente los epítomos de células B humanas del SS1P, examinamos la reactividad del SS1-LR/GGS/8M con sueros de los pacientes que desarrollaron anticuerpos neutralizantes mientras eran sometidos a tratamiento con SS1P. En los cinco casos que sometimos a prueba, el SS1-LR/GGS/8M mostró una antigenicidad considerablemente reducida en comparación el SS1P. Este resultado es compatible con las observaciones de HA22 y HA22-LR/8M Onda M, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108: 5742-7),e indica que hemos identificado y removido muchos de los epítomos inmunogénicos en las RIT a base de PE.

Se evaluó la citotoxicidad del SS1-LR/GGS/8M en varias líneas celulares, un modelo tumoral de ratón, y células primarias de pacientes con mesotelioma. El SS1-LR/GGS/8M demostró una excelente citotoxicidad en relación con el SS1P en las líneas celulares de cáncer pulmonar y mesotelioma, pero fue deficientemente activo en las líneas celulares de cáncer ovárico. Este resultado es inesperado, porque las líneas ováricas fueron sensibles al SS1-LR/GGS, e indica que las ocho mutaciones puntuales en el dominio catalítico de la PE pueden estar interfiriendo en la actividad del SS1-LR/GGS/8M. En el modelo tumoral de ratón, los tumores de xenoinjerto L55 respondieron en forma similar al SS1-LR/GGS/8M y el SS1P, si bien se podrían administrar dosis más altas de SS1-LR/GGS/8M para aumentar el efecto antitumoral. Finalmente, cuando se sometió a prueba contra células malignas primarias de pacientes con mesotelioma, el SS1-LR/GGS/8M presentó una citotoxicidad notablemente

aumentada por sobre el SS1P. En términos generales, nuestra evaluación del SS1-LR/GGS/8M mostró una excelente actividad citotóxica.

Además de la alta actividad y la baja antigenicidad, el SS1-LR/GGS/8M mostró una toxicidad no específica disminuida en relación con el SS1P. El modelo de rata para el síndrome de extravasación capilar inducida por RIT demostró efectivamente esta diferencia. No se registraron diferencias importantes entre las ratas tratadas con PBS y las tratadas con SS1-LR/GGS/8M, en tanto que las ratas tratadas con SS1P desarrollaron una acumulación de líquido debilitante en los pulmones. El síndrome de extravasación capilar (también denominado síndrome de extravasación vascular) ocurre cuando el líquido se filtra de los capilares, conduciendo a una falla en la albúmina sérica, retención de líquido, edema y aumento de peso. Se ha observado frecuentemente esta toxicidad en pacientes tratados con una variedad de inmunotoxinas, incluyendo las a base de PE, y dicha toxicidad supuestamente es causada como resultado del daño celular endotelial fuera de lo proyectado. El limitar la toxicidad no dirigida de las RIT puede potencialmente aumentar su eficacia permitiendo que se administren dosis más altas en forma segura. Este experimento, junto con los demás descritos en la presente, indica que el SS1-LR/GGS/8M sería un excelente candidato para el ambiente clínico. La baja antigenicidad, la baja toxicidad no específica, y la alta citotoxicidad del SS1-LR/GGS/8M son sumamente esperanzadoras para el desarrollo futuro de RIT anti-mesotelina.

Se entiende que los ejemplos y modalidades descritos en la presente son con fines ilustrativos solamente y que diversas modificaciones o cambios a la luz de lo mismo serán sugeridos a los especialistas en la materia y han de ser incluidos dentro del espíritu y campo de la presente solicitud y alcance las reivindicaciones adjuntas. Todos los números de acceso, publicaciones, patentes, y solicitudes de patente citadas en la presente *se incorporan* por referencia en su totalidad para todos los fines.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula quimérica que comprende un polipéptido de fusión que tiene la fórmula M-L1-FCS-FL-dominio funcional III de la PE, caracterizado porque

M es un anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina o a un fragmento de la misma que se une específicamente a la mesotelina;

L1 consta de 1 a 10 residuos de aminoácido continuo;

FCS es un sitio de corte de furina que consta de residuos de aminoácido continuos capaces de ser cortados por furina;

FL consta de 3 a 8 residuos de aminoácidos continuos seleccionados independientemente de la glicina y la serina;

el dominio funcional III de la PE consta de residuos de aminoácidos continuos idénticos en la secuencia a SEQ ID NO:1 de la posición 395 a 613, que comprende opcionalmente (i) sustituciones en uno o más residuos correspondientes a 609-613 de la SEQ ID NO:1, (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de la SEQ ID NO:1, (iii) una sustitución de uno más residuos correspondientes a residuos de la SEQ ID NO: 1, residuos de la SEQ ID NO:1 que mantienen la inmunogenicidad de un epítipo o subepítipo del dominio III de la PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i)-(iii).

2. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque el anticuerpo es un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)'₂, proteínas Fv de cadena simple ("scFv") o un fragmento de proteína Fv estabilizada por disulfuro ("dsFv").

3. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque el fragmento de anticuerpo comprende regiones variables de inmunoglobulina de cadena liviana y pesada estabilizadas por disulfuro fusionadas con el resto de la molécula a través de la unión de la cadena pesada a L1.

4. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque el anticuerpo comprende:

una cadena V_H que comprende una secuencia de aminoácido CDR1 de GYTMN (SEQ ID NO:51), una secuencia de aminoácido CDR2 de LITPYNGASSYNQKFRG (SEQ ID NO:52), y una secuencia de aminoácido CDR3 de GGYDGRGFDY (SEQ ID NO:53), y

una cadena V_L que comprende una secuencia de aminoácido CDR1 de SASSSVSYM (SEQ ID NO: 54), una secuencia de aminoácido CDR2 de DTSKLAS (SEQ ID NO: 55), y una secuencia de aminoácido CDR3 seleccionada del grupo compuesto por QQWSGYPLT (SEQ ID NO: 56), QQWSKHPLT (SEQ ID NO: 57), QQWSGHPLT (SEQ ID NO: 58), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 59), QQWSQIPLT (SEQ ID NO: 60), QQWGFNPLT (SEQ ID NO: 61), QQWGTNPLT (SEQ ID NO: 62), QQWGSHPPLT (SEQ ID NO: 63), QQWGDFPLT (SEQ ID NO: 64), QQWGDHPLT (SEQ ID NO: 65), QQWSAHPLT (SEQ ID NO: 66), y QQWSGYPTT (SEQ ID NO :67).

5. La molécula de la reivindicación 4, caracterizada porque la secuencia de aminoácido de CDR3 de V_L es QQWSKHPLT (SEQ ID NO: 57).

6. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque L1 tiene 3 a 5 aminoácidos de longitud.

7. La molécula de la reivindicación 4, caracterizada porque L1 es ASGG (SEQ ID NO: 19).

8. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque el dominio III de la PE tiene una sustitución de alanina, glicina o serina de al menos un residuo de aminoácido correspondiente a un residuo de aminoácido de la SEQ ID NO:1, seleccionado del grupo compuesto por D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597.

9. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque el dominio III de la PE tiene una sustitución de alanina, glicina o serina de al menos un residuo de aminoácido correspondiente a un residuo de aminoácido de la SEQ ID NO:1, seleccionado del grupo compuesto por D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592.

10. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque FL es GGS, (GGS)₂ (SEQ ID NO: 18), GSGG (SEQ ID NO: 71), GSGGG (SEQ ID NO: 72), GSGG (SEQ ID NO: 73), GSG, o GGG.

11. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque FL es GGS.

12. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque la secuencia de corte por furina es RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 17).

13. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque el dominio funcional III de la PE es el dominio funcional III de la PE de LR que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4 de la posición 20 a 237 o de la SEQ ID NO: 5 de la posición 20 a 237.

14. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque la porción dirigida comprende una cadena liviana variable SS1 estabilizada por disulfuro de la SEQ ID NO: 6 y una cadena pesada variable SS1 de la secuencia SEQ ID NO: 7.

15. La molécula de la reivindicación 1, caracterizada porque la molécula comprende la cadena liviana variable SS1 de la SEQ ID NO: 6 y el polipéptido de fusión de PE de la cadena pesada variable SS1 de la SEQ ID NO: 8, caracterizada porque las cadenas liviana y pesada variables forman un anticuerpo estabilizado por disulfuro.

16. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el FCS es idéntico en secuencia a la SEQ ID NO: 1 de la posición 274 a 284 o de la secuencia de aminoácido RHRSKRGWEQL (SEQ ID NO: 29).

17. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. Un ácido nucleico que codifica una molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

19. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 18.

20. La célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 18.

21. Un método para tratar un cáncer que sobreexpresa la mesotelina en un sujeto que necesita de ella, que comprende la administración de una molécula quimérica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 al sujeto.

22. El método de la reivindicación 21, caracterizado porque el cáncer es un adenocarcinoma de pulmón, un carcinoma ovárico, un mesotelioma o un carcinoma epidermoide.

23. Un polipéptido de fusión que tiene la fórmula FCS-FL-Dominio funcional III de la PE, caracterizado porque:

FCS consta de residuos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a la SEQ

ID NO: 1 de la posición 274 a 284 o de la secuencia de aminoácidos RHRSKRGWEQL (SEQ ID NO: 17);

FL consta de 3 a 8 residuos de aminoácidos continuos seleccionados de manera independiente de la glicina y la serina;

el Dominio funcional III de la PE consta de residuos de aminoácidos continuos idénticos en secuencia a la SEQ ID NO: 1 de la posición 395 a 613, que opcionalmente comprende (i) sustituciones en uno o más residuos correspondientes a 609-613 de la SEQ ID NO: 1, (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de la SEQ ID NO: 1, (iii) una sustitución de uno o más residuos correspondientes a los residuos de la SEQ ID NO:1, residuos de la SEQ ID NO:1 que mantienen la inmunogenicidad de un epítipo o sub-epítipo del domino III de la PE, o (iv) una combinación de cualquier a de (i)-(iii).

24. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 19.

Figura 1

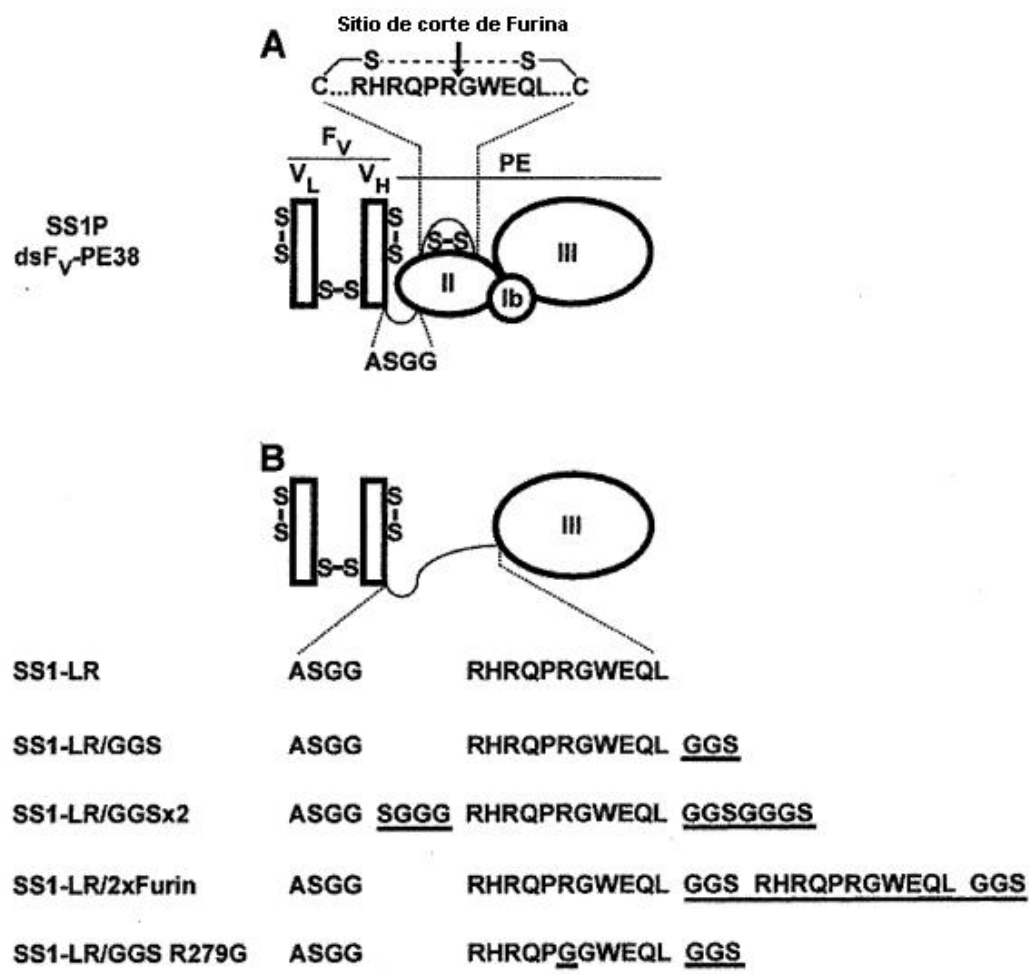


Figura 2

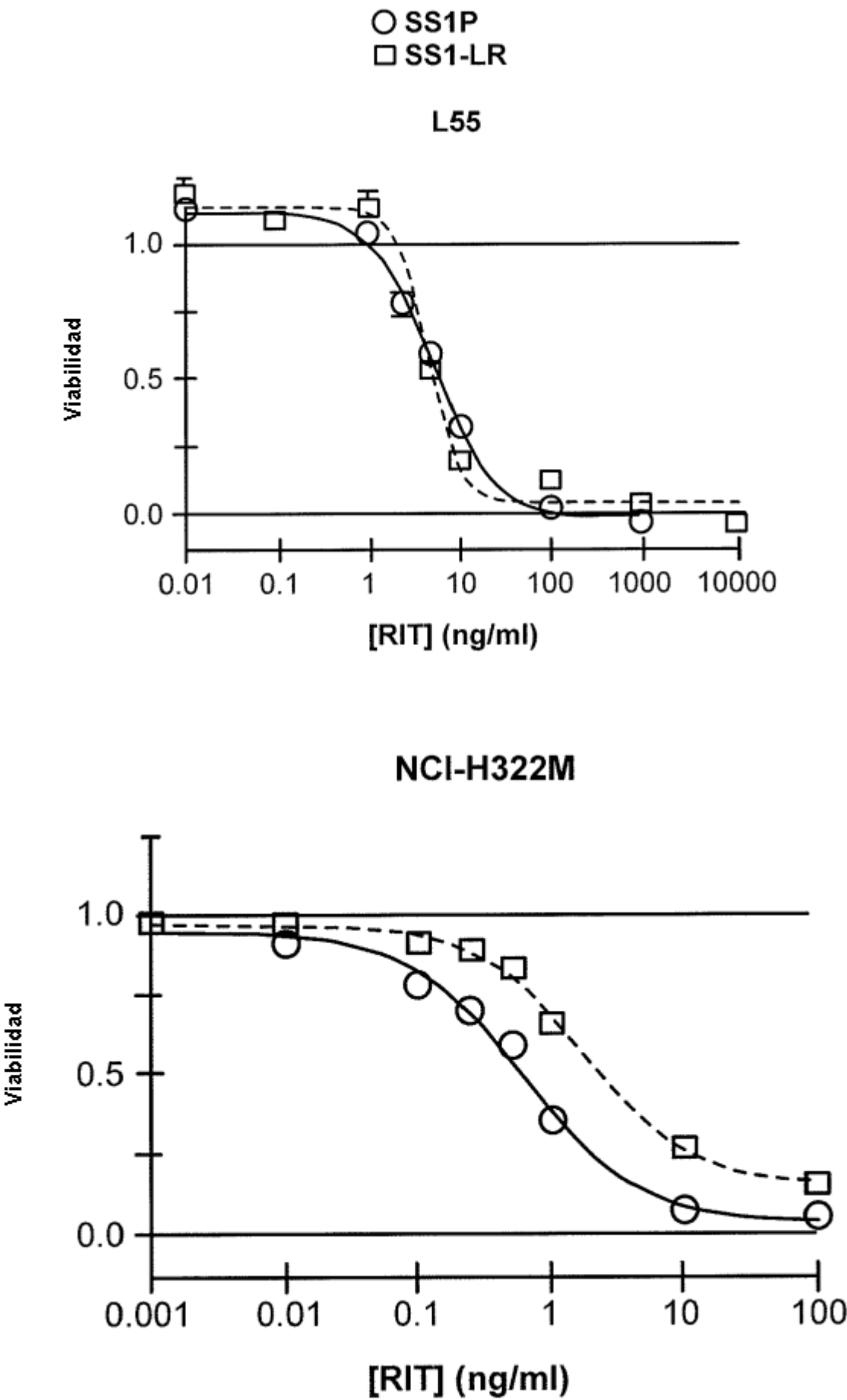


Figura 2 (continuación)

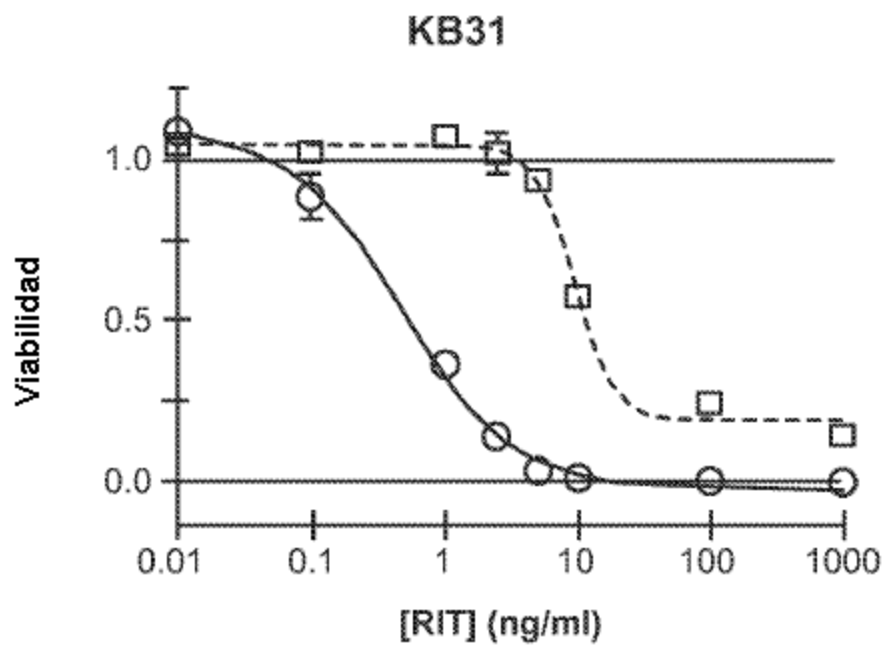
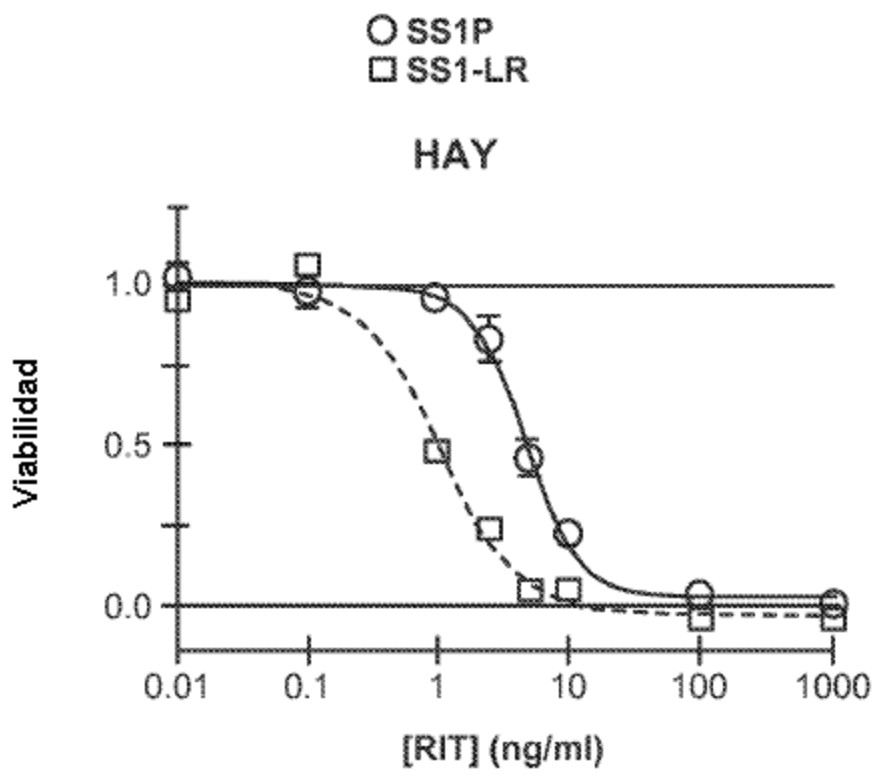


Figura 2 (Continuación)

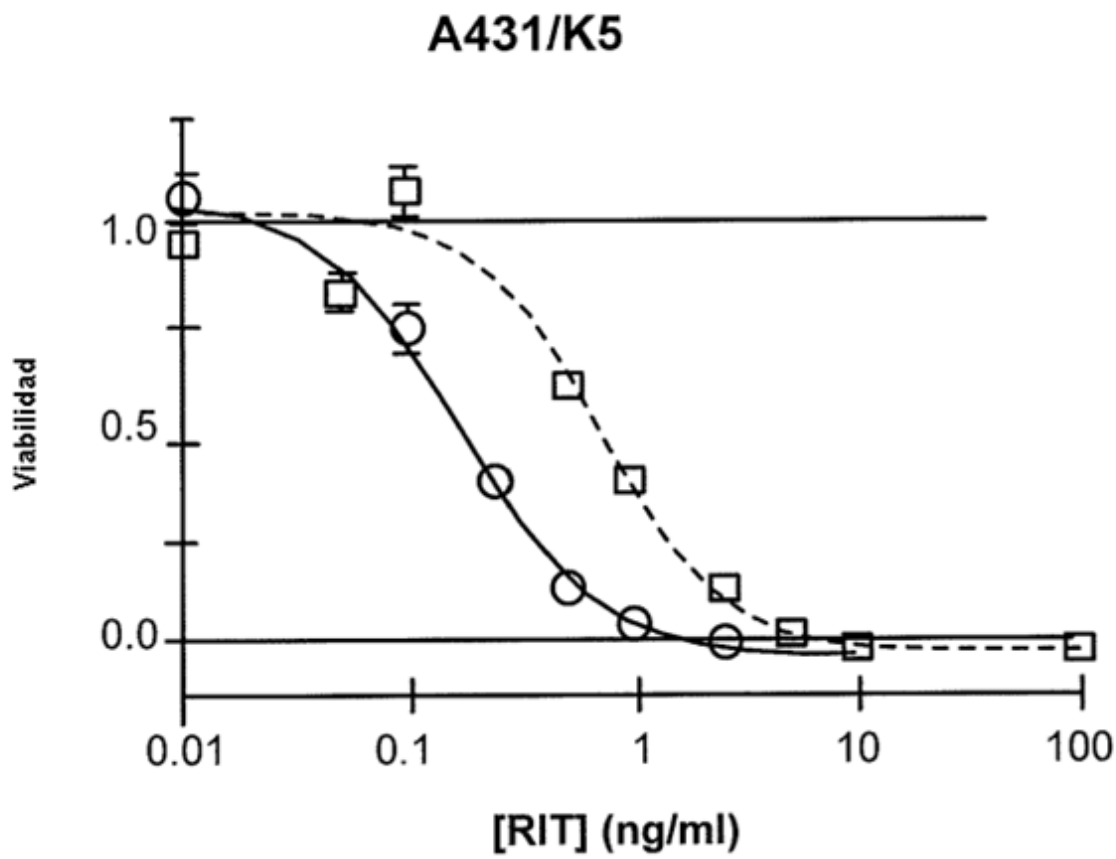
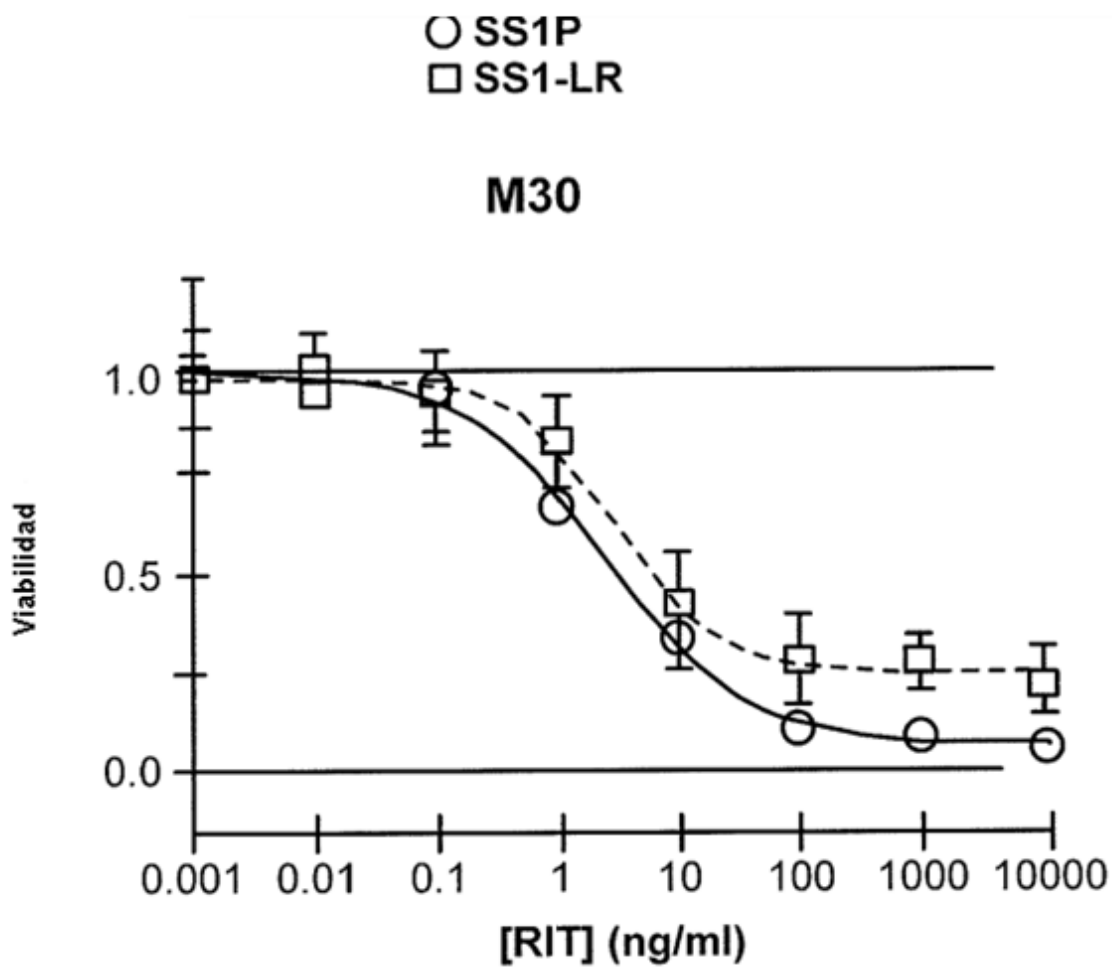
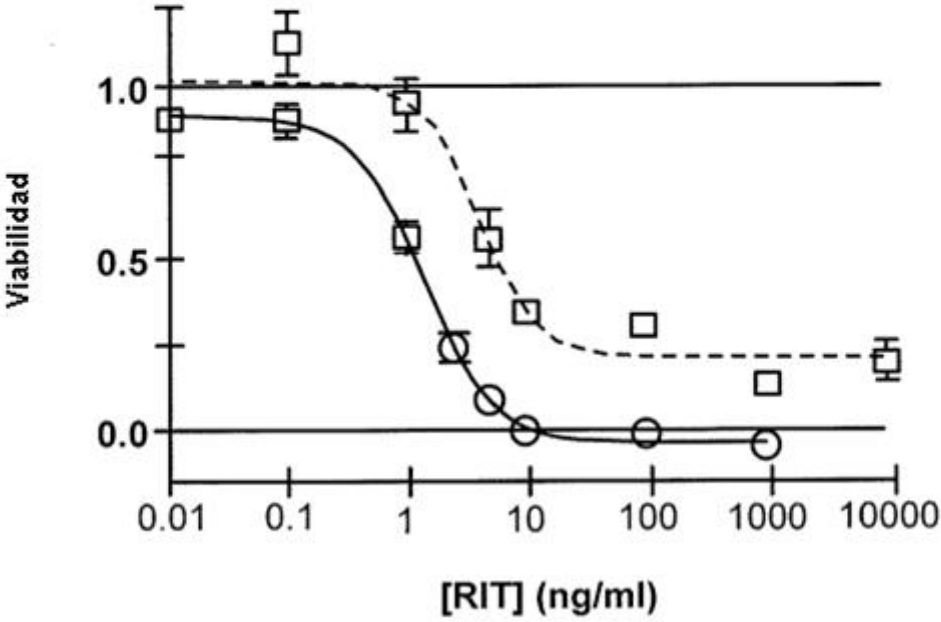


Figura 2 (Continuación)

○ SS1P
□ SS1-LR

OVCAR-8



A1847

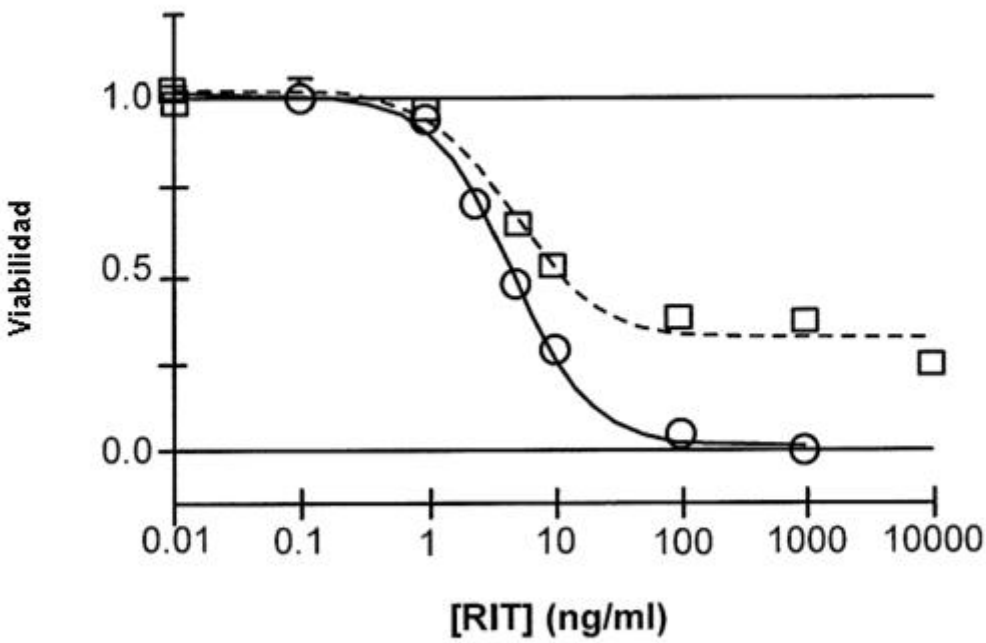


Figura 3

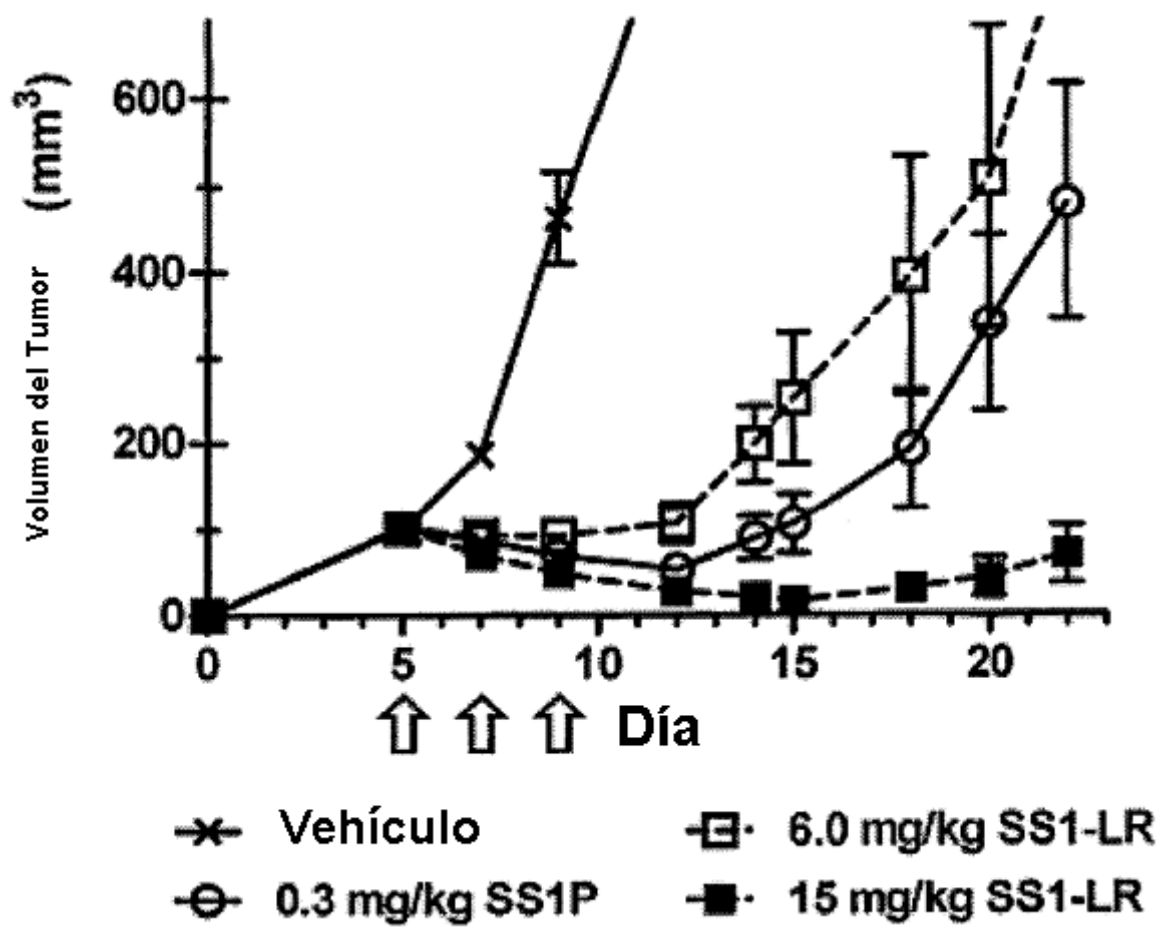


Figura 4

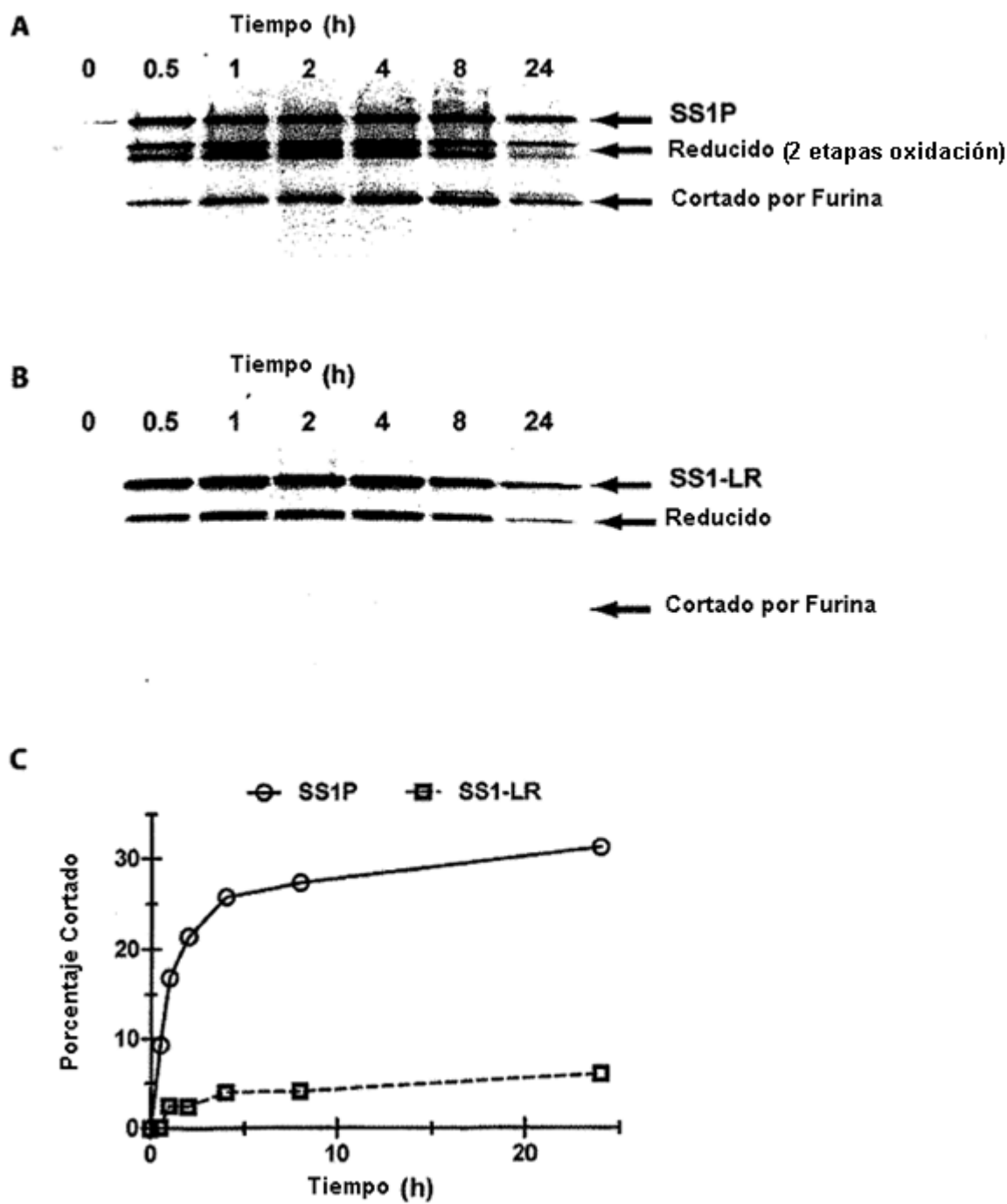


Figura 5

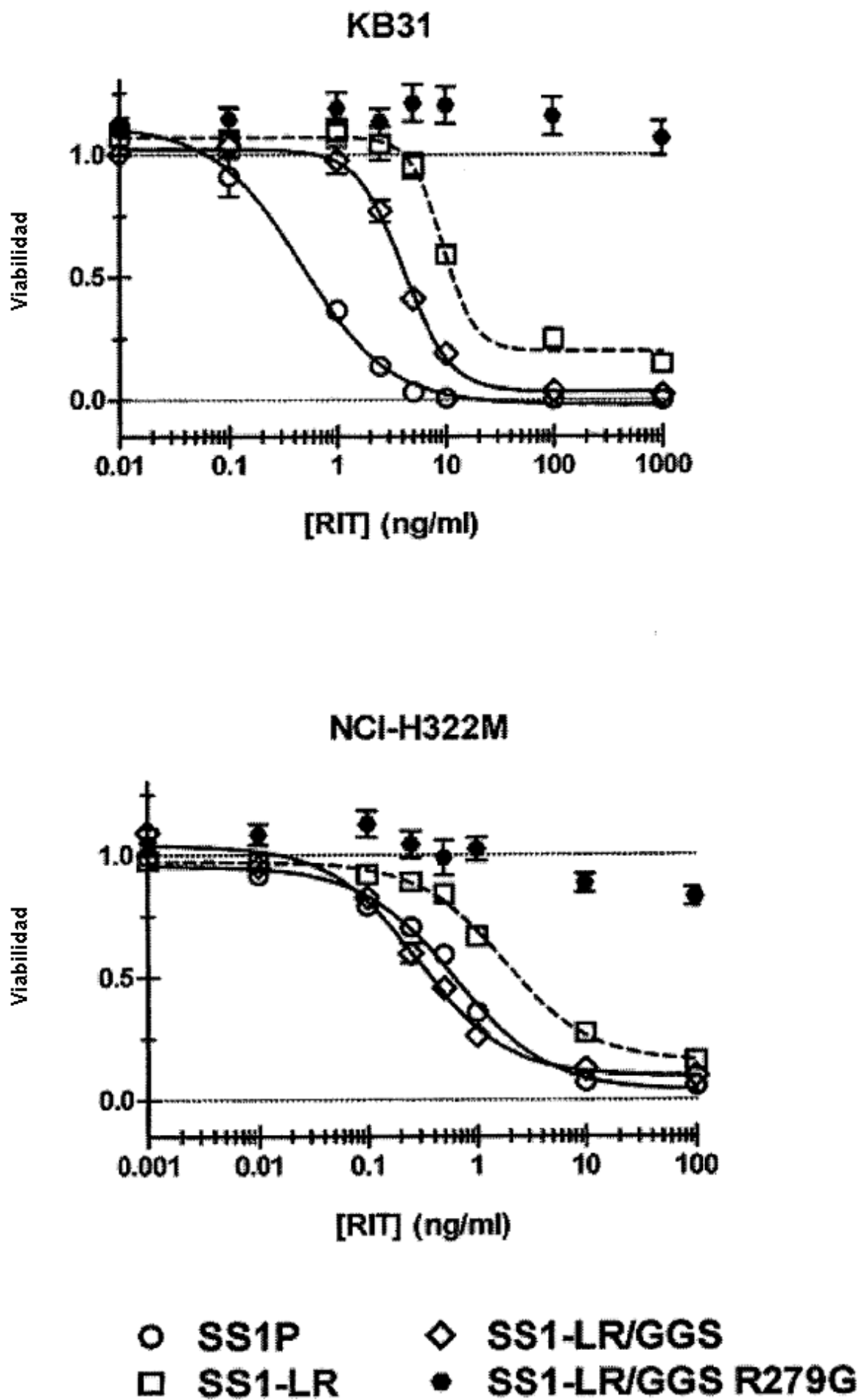


Figura 6

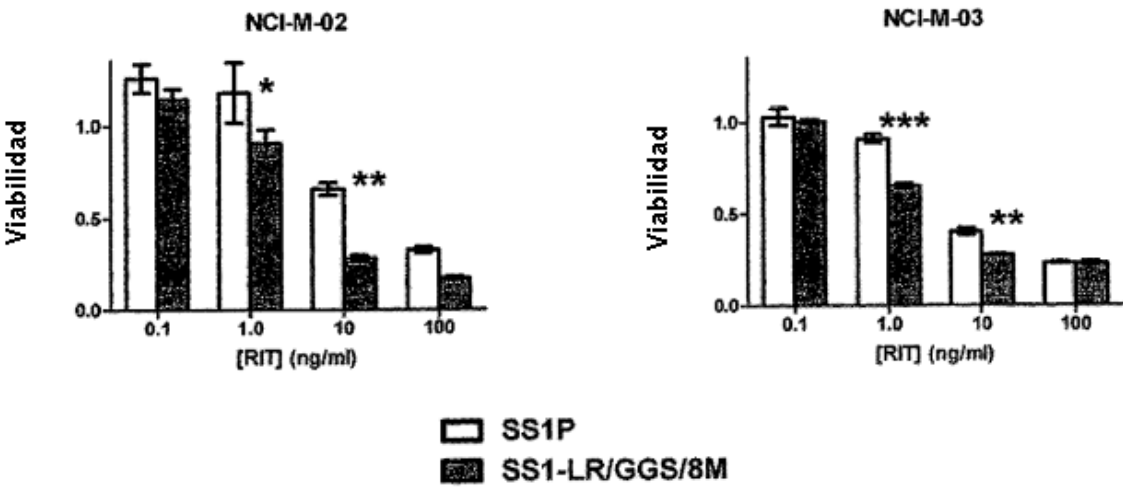


Figura 7

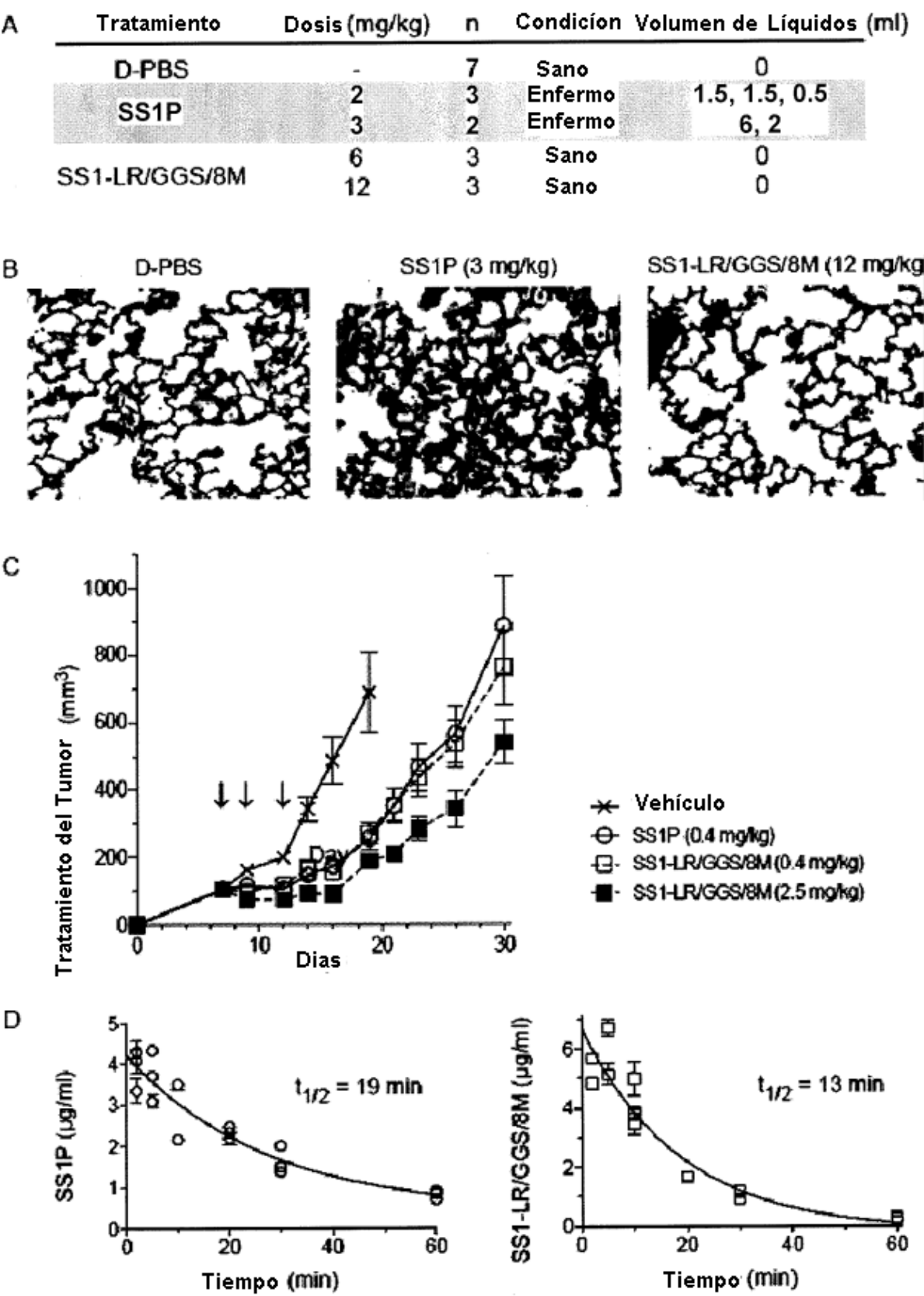


Figura 8

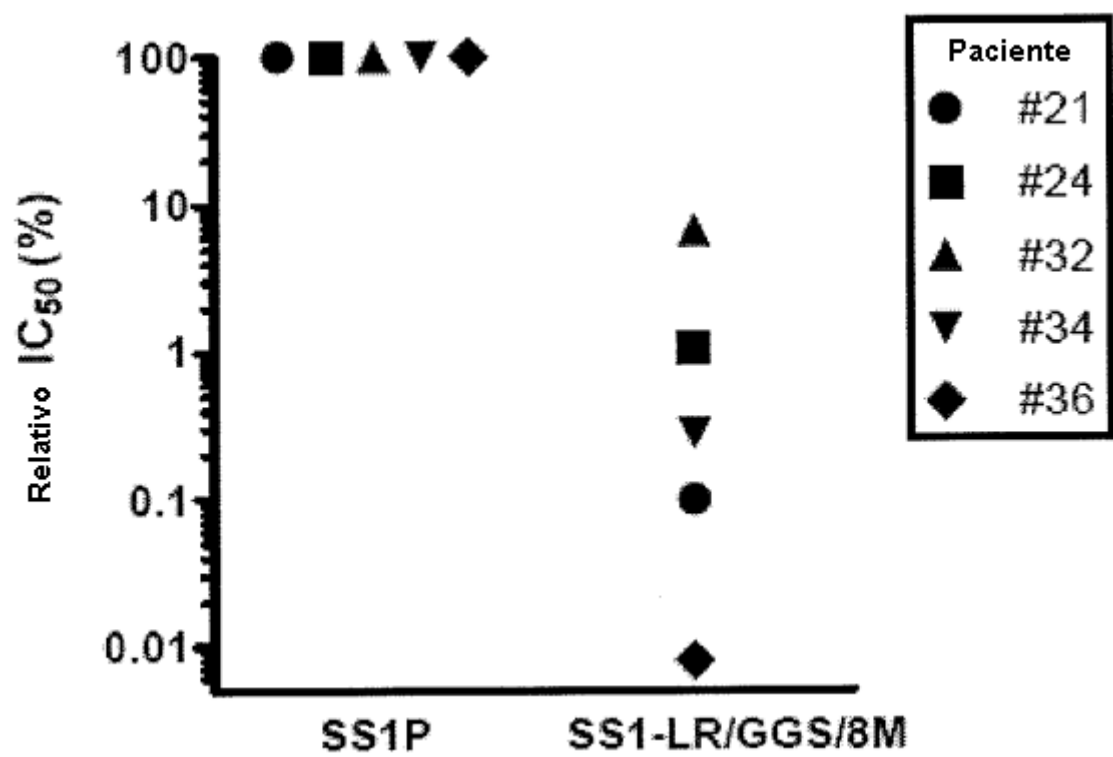
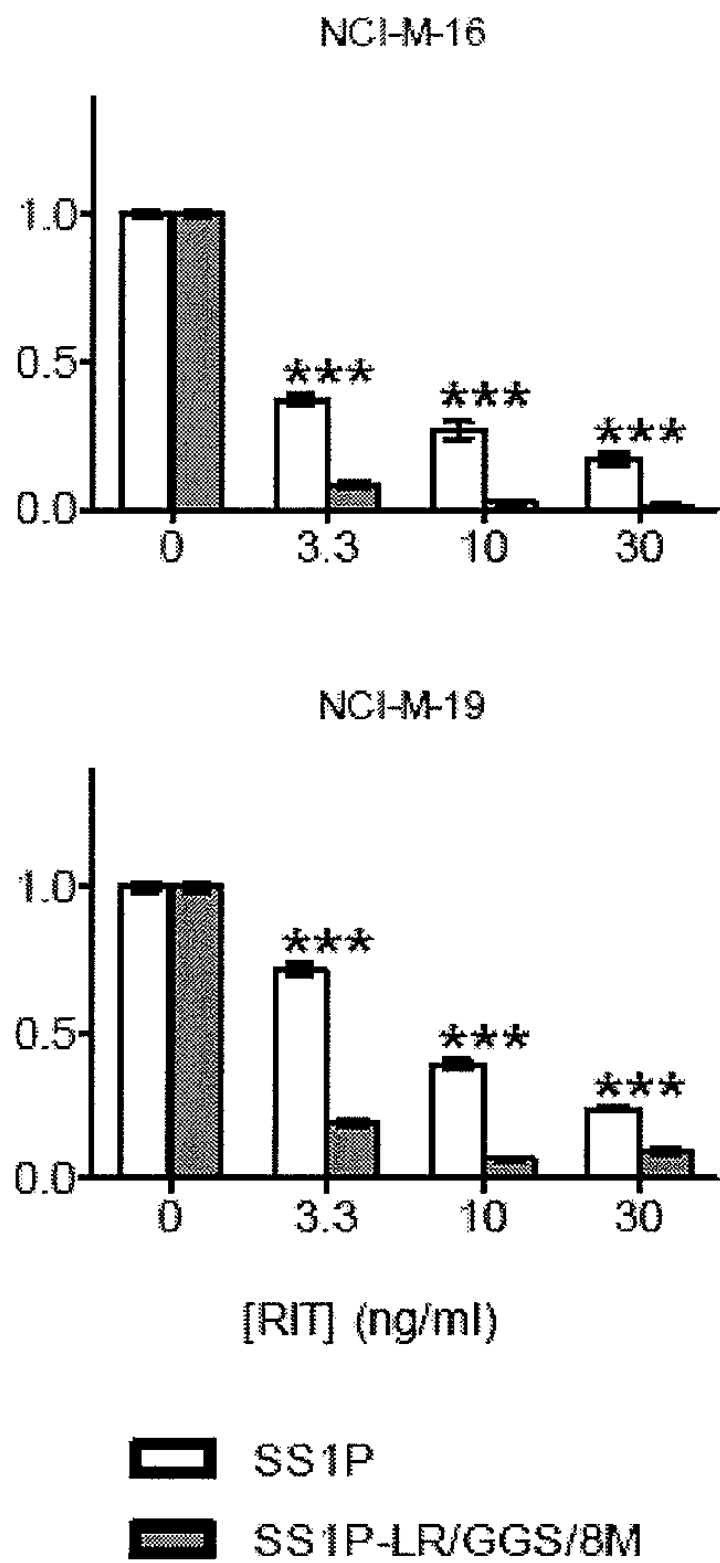


Figura 9



 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 21-11-13 (30) Prioridad (31) No. Prioridad 61/483,531 (32) Fecha 06-05-11 (33) País US	(51) Int Cl: A61K 39/00 (71) Solicitante(s): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (72) Inventor(es): PASTAN, Ira, H.; WELDON, John y BEERS, Richard. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 06-12-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 04-05-12 No. de solicitud: PCT/US2012/036456	(87) Publicación internacional Fecha: 15-11-12 No. publicación: WO 2012/154530 A1
(54) Título: "INMUNOTOXINA RECOMBINANTE DIRIGIDA A LA MESOTELINA"	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La mesotelina es un antígeno de diferenciación presente en la superficie de los cánceres de ovario, mesoteliomas y varios otros tipos de cánceres humanos. Puesto que entre los tejidos normales, la mesotelina está presente solo en las células mesoteliales, representa un buen blanco para la entrega de agentes citotóxicos mediada por anticuerpo. La presente invención está dirigida a mejores inmunotoxinas recombinantes que comprenden anticuerpos anti-mesotelina, incluyendo moléculas Fv con afinidad particularmente alta por la mesotelina, y una mitad de Exotoxina de Pseudomonas, que ha sido modificada para reducir su inmunogenicidad y la sensibilidad a la proteasa, y proporcionan una mejor citotoxicidad para las células que expresan la mesotelina. Las RIT son adecuadas para el tratamiento de cánceres de ovarios, estómago, células escamosas, mesoteliomas y otras células malignas que expresan la mesotelina.

Sector: Química Farmacéutica, específicamente inmunotoxinas recombinantes que comprenden anticuerpos anti-mesotelina, composiciones farmacéuticas que los comprenden. Útiles en el tratamiento del cáncer de ovario, estomago, células escamosas, mesoteliomas y otras células malignas que expresan la mesotelina.

LISTADO DE SECUENCIA INFORMAL

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Pastan, Ira H.

Weldon, John

Hasan, Raffit

<120> Inmunotoxina recombinante dirigida a mesotelina

<130> 77867-803685

<140> US Aún no asignada

<141> Aún no asignada

<160> 73

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 613

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<220>

<223> exotoxina de Pseudomonas nativa A (PE)

<400> 1

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

Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
 225 230 235 240
 Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
 245 250 255
 Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
 260 265 270
 Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
 275 280 285
 Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
 290 295 300
 Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
 325 330 335
 Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
 340 345 350
 Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
 370 375 380
 Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
 385 390 395 400
 Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
 405 410 415
 Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
 420 425 430
 Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
 435 440 445

Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
 450 455 460
 Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 465 470 475 480
 Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
 485 490 495
 Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 500 505 510
 Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
 515 520 525
 Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
 530 535 540
 Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
 545 550 555 560
 Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
 565 570 575
 Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
 580 585 590
 Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 595 600 605
 Arg Glu Asp Leu Lys
 610

<210> 2

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> exotoxina A de Pseudomonas sintética con inmunogenicidad reducida

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)...(230)

<223> Xaa = Gly, Ala or Ser

<400> 2

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu

1 5 10 15

Phe Leu Gly Asp Gly Gly Xaa Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln

20 25 30

Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Xaa Gly Arg Ile Arg Asn

100 105 110

Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe

115 120 125

Tyr Xaa Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val

130 135 140

Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
 145 150 155 160
 Gly Pro Glu Glu Xaa Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
 165 170 175
 Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
 180 185 190
 Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Xaa Glu
 195 200 205
 Xaa Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
 210 215 220
 Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 225 230

<210> 3

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> exotoxina A de Pseudomonas modificada

PE-LR/GGS/8M

<400> 3

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

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

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> exotoxina A de Pseudomonas modificada sintética

PE-LR/FL/8X

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12) ... (14)

<223> Xaa = Gly o Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15) ... (19)

<223> Xaa = Gly o Ser, pueden estar presentes o ausentes

<220>

<221> VARIANTE

<222> (20) ... (230)

<223> Xaa = Gly, Ala o Ser

<400> 4

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Xaa Val

<210> 5

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> exotoxina A de Pseudomonas modificada sintética

PE-LR/FL/8M

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12) ... (14)

<223> Xaa = Gly o Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15) ... (19)

<223> Xaa = Gly o Ser, pueden estar presentes o ausentes

<400> 5

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val

20

25

30

Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu

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

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético SS1

Cadena liviana variable (VL)

<400> 6

Met Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro

1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr

20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile

35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 7

<211> 355

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético SS1

Cadena pesada variable (VH)

<400> 7

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly

20 25 30

Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys

50 55 60

Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys

115 120

<210> 8

<211> 358

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético SS1

Inmunotoxina recombinante SS1-LR/GGS/8M

Cadena pasada variable (VH-PE)

<400> 8

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly

20 25 30

Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys

50 55 60

Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Arg His Arg

115 120 125

Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser Pro Thr Gly Ala Glu

130 135 140

Phe Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln

145 150 155 160

Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu

165 170 175

Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
 180 185 190
 Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp
 195 200 205
 Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr
 210 215 220
 Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala Gly Arg Ile Arg Asn
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe
 245 250 255
 Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val
 260 265 270
 Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
 275 280 285
 Gly Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
 290 295 300
 Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
 305 310 315 320
 Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Ser Glu
 325 330 335
 Ala Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
 340 345 350
 Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 355

<210> 9

<211> 358

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Immunotoxina recombinante SS1-LR/GGS/8X

Cadena pesada variable (VH-PE)

<400> 9

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

305		310		315		320									
Arg	Asn	Val	Gly	Gly	Asp	Leu	Asp	Pro	Ser	Ser	Ile	Pro	Asp	Lys	Glu
				325					330					335	
Gln	Ala	Ile	Ser	Ala	Leu	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gln	Pro	Gly	Lys	Pro
			340					345					350		
Pro	Arg	Glu	Asp	Leu	Lys										
		355													

<210> 10

<211> 324

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético SS1

Cadena liviana variable (V-L)

<400> 10

```

atggacatcg agctcactca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggct 60
accatgacct gcagtgccag ctcaagtgtg agttacatgc actggtacca gcagaagtca 120
ggcacctccc caaaagatg gatttatgac acatccaaac tggcttctgg agtcccaggt 180
cgcttcagtg gcagtgggtc tggaaactct tactctctca caatcagcag cgtggagggt 240
gaagatgatg caacttatta ctgccagcag tggccaagc accctctcac gttcggttgc 300
gggacaaagt tggaaataaa ataa                                     324

```

<210> 11

<211> 1068

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético SS1

Inmunotoxina recombinante SS1-LR

Cadena pesada variable (VH-PE)

<400> 11

```

atgcaggtac aactgcagca gtctgggcct gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatcctgca aggcattctgg ttactcattc actggctaca ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcattgaa agtgccttga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180
tacaaccaga agttcagggg caaggccaca ttaactgtag acaagtcac cagcacagcc 240
tacatggacc tcctcagtct gacatctgaa gactctgcag tctatttctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggagggggtt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
aaagcttccg gaggtcgtca ccgtcaacca cgcgggtggg aacagctgcc aaccgggtgcc 420
gagttcctgg gcgacggtgg cgatgtgtcc tttagcacc ccgtgtaccca gaactggacg 480
gtagagcgcc tgctgcaggc acatcgtcag ctggaagagc gtggctatgt attcgttggc 540
taccacggca cttttctgga agcagctcag tccatcgtgt ttggtggtgt ccgtgcccg 600
tctcaagacc tggatgcgat ttggcgtggg ttctacattg caggcgatcc agcgtcggca 660
tacggttatg cgcaggacca ggaaccggat gctcgcggtc gcattcgtaa tgggtgcgctg 720
ctgcgcgtat atgtgccgcg ttccagcctg ccgggcttct accgcactag cctgaccctg 780
gccgcgccgg aggcggcggg tgaagtggaa cgtctgattg gtcacacctt gcctctgcgc 840
ctggatgcca tcaccggccc agaggaggag ggcggtcgtc tggaaaccat tctgggctgg 900
ccgctggctg aacgtacggg cgttattccg agcgcgattc ctaccgatcc tcgtaacggt 960
ggcggcgatc tggaccatc ttctattcca gataaggagc aggcaatctc cgcgctgcgc 1020
gattatgcaa gccaacggg taaaccacct cgtgaagatc tgaaataa 1068

```

<210> 12

<211> 1077

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético SS1

Immunotoxina recombinante SS1-LR/GGS/8M

Cadena pesada variable (VH-PE)

<400> 12

```

atgcaggtac aactgcagca gtctgggcct gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatcctgca aggcatctgg ttactcattc actggctaca ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcattgaa agtgccttga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180
tacaaccaga agttcagggg caaggccaca ttaactgtag acaagtcac cagcacagcc 240
tacatggacc tcctcagtct gacatctgaa gactctgcag tctatttctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggaggggttt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
aaagcttccg gaggtcgtca tcgccagccg cgcggctggg aacaactggg tggaagtccc 420
actggcgcgg agttcctcgg cgacggcggc gcagtcagct tcagcaccgc cggcacgcag 480
aactggacgg tggagcggct gctccaggcg caccgccaac tggaggaggg cggctatgtg 540
ttcgtcggct accacggcac ctctctcgaa gcggcgcaaa gcatcgtctt cggcggggtg 600
cgcgcgcgca gccaggacct cgacgcgata tgggcccgtt tctatatcgc cggcgatccg 660
gcgctggcct acggctacgc ccaggaccag gaacccgacg cagccggccg tatccgcaac 720
ggtgccctgc tgcgggtcta tgtgccgcgc tcgagcctgc cgggcttcta cgccaccagc 780
ctgaccctgg ccgcgcggga ggcggcgggc gaggtcgaac ggctgatcgg ccatccgctg 840
ccgctgcgcc tggacgccat caccggcccc gaggagtcag gcgggcgcct ggagaccatt 900
ctcggctggc cgctggccga gcgcaccgtg gtgattccct cggcgatccc caccgaccgc 960
cgcaacgtcg gcggcgacct cgaccgctcc agcatccccg acagcgaagc agcgatcagc 1020
gccctgccgg actacgccag ccagcccggc aaaccgccgc gcgaggacct gaagtaa 1077

```

<210> 13

<211> 1068

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético SS1

Inmunotoxina recombinante SS1-LR/8M

Cadena pesada variable (VH-PE)

<400> 13

```

atgcaggtac aactgcagca gtctgggcct gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatcctgca aggcatctgg ttactcattc actgggtaca ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcattgaa agtgccttga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180
tacaaccaga agttcagggg caaggccaca ttaactgtag acaagtcac cagcacagcc 240
tacaatggacc tctcagttct gacatctgaa gactctgcag tctatttctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggagggggtt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
aaagcttccg gaggtcgta tcgccagccg cgcggctggg aacaactgcc cactggcgcg 420
gagttcctcg gcgacggcgg cgcagtcagc ttcagcacc ccgggcacga gaactggacg 480
gtggagcggc tgctccaggc gcaccgcca ctggaggagg gcggctatgt gttcgtcggc 540
taccacggca cttcctcga agcggcgcaa agcatcgtct tcggcggggt gcgcgcgcgc 600
agccaggacc tcgacgcgat ctgggcccgt ttctatatcg ccggcgatcc ggcgctggcc 660
tacggctacg ccaggacca ggaaccgcac gcagccggcc gtatccgcaa cggtgccctg 720
ctgcgggtct atgtgcgcg ctcgagcctg ccgggcttct acgccaccag cctgaccctg 780
gccgcgcggg aggcggcggg cgaggctgaa cggctgatcg gccatccgct gccgctgcgc 840
ctggacgcca tcaccggccc cgaggagtca ggcgggcgcc tggagaccat tctcggctgg 900
ccgctggccg agcgcaccgt ggtgattccc tcggcgatcc ccaccgacc gcgcaacgtc 960
ggcgggcgacc tcgaccgctc cagcatcccc gacagcgaag cagcgatcag cgcctgccc 1020
gactacgcca gccagcccgg caaacgcgcg cgcgaggacc tgaagtaa 1068

```

<210> 14

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo Fv anti-mesotelina sintético (SS scFv)

<400> 14

```

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

```

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr
 165 170 175
 Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
 180 185 190
 Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr
 195 200 205
 Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 210 215 220
 Trp Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 225 230 235 240
 Lys

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> residuos de terminal C sintético de PE nativo

<400> 15

Arg Glu Asp Leu Lys

1

5

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> retículo endoplasmático canónico sintético

Señal de retención

<400> 16

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética (FCS)

<400> 17

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu

1

5

10

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker flexible sintético (FL)

<400> 18

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1

5

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker sintético de péptido corto

<400> 19

Ala Ser Gly Gly

1

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker sintético de péptido corto y corte de furina

Sitio para SS1-LR

<400> 20

Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu

1

5

10

15

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker sintético de péptido corto y corte de furina

Sitio para SS1-LR/GGS

<400> 21

Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly

1

5

10

15

Gly Ser

<210> 22

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker sintético de péptido corto y corte de furina

Sitio para SS1-LR/GGSx2

<400> 22

Ala Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp

1

5

10

15

Glu Gln Leu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

20

25

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker sintético de péptido corto y corte de furina

Sitio para SS1-LR/2xFurina

<400> 23

Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly

1

5

10

15

Gly Ser Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser

20

25

30

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker sintético de péptido corto y corte de furina

Sitio para SS1-LR/GGS R279G

<400> 24

Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Gly Gly Trp Glu Gln Leu Gly

1

5

10

15

Gly Ser

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de linker scFv sintético

<400> 25

Gly Val Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1

5

10

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> retículo endoplasmático de término carboxilo sintético

Señal de retención

<400> 26

Arg Glu Asp Leu

1

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> residuos de PE de terminal mutado sintético

<400> 27

Arg Glu Glu Leu

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> residuos de PE de terminal mutado sintético

<400> 28

Arg Asp Glu Leu

1

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sustituida sintética

<400> 29

Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu

1

5

10

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina mínima sintética

<400> 30

Arg Lys Lys Arg

1

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina mínima sintética

<400> 31

Arg Arg Arg Arg

1

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina mínima sintética

<400> 32

Arg Lys Ala Arg

1

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 33

Ser Arg Val Ala Arg Ser

1

5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 34

Thr Ser Ser Arg Lys Arg Arg Phe Trp

1

5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 35

Ala Ser Arg Arg Lys Ala Arg Ser Trp

1

5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 36

Arg Arg Val Lys Lys Arg Phe Trp

1

5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 37

Arg Asn Val Val Arg Arg Asp Trp

1

5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 38

Thr Arg Ala Val Arg Arg Arg Ser Trp

1

5

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 39

Arg Gln Pro Arg

1

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 40

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp

1

5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 41

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu

1

5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 42

His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln

1

5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 43

Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu

1

5

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 44

Arg Ser Lys Arg

1

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 45

Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp

1

5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 46

His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu

1

5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 47

Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu

1

5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 48

His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu

1

5

10

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de corte de furina sintética

<400> 49

Arg His Arg Ser Lys Arg

1

5

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker de peptido scFv sintético

<400> 50

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena pesada variable CDR1

<400> 51

Gly Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena pesada variable CDR2

<400> 52

Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena pesada variable CDR3

<400> 53

Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR1

<400> 54

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR2

<400> 55

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1

5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 56

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 57

Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr

1

5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 58

Gln Gln Trp Ser Gly His Pro Leu Thr

1

5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 59

Gln Gln Trp Ser Ala His Pro Leu Thr

1

5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 60

Gln Gln Trp Ser Gln Ile Pro Leu Thr

1

5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 61

Gln Gln Trp Gly Phe Asn Pro Leu Thr

1

5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 62

Gln Gln Trp Gly Thr Asn Pro Leu Thr

1

5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 63

Gln Gln Trp Gly Ser His Pro Leu Thr

1

5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 64

Gln Gln Trp Gly Asp Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 65

Gln Gln Trp Gly Asp His Pro Leu Thr

1

5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 66

Gln Gln Trp Ser Ala His Pro Leu Thr

1

5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal anti-mesotelina sintético

Cadena liviana variable CDR3

<400> 67

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Thr Thr

1

5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker sintético que se une al término de carboxilo

Ddl anticuerpo al término N del sitio de corte de la furina

<400> 68

Ala Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1

5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker flexible sintético

<400> 69

Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker flexible sintético

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

<210> 71

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker flexible sintético (FL)

<400> 71

Gly Ser Gly Gly

1

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker flexible sintético (FL)

<400> 72

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

<210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> linker flexible sintético (FL)

<400> 73

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 74

<211> 355

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> inmunotoxina recombinants de anticuerpo monoclonal anti-mesotelina
sintético SS1-LR cadena pesada variable (VH-PE)

<400> 74

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly

1

5

10

15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly

20

25

30

Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp

35

40

45

Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys

50

55

60

Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65

70

75

80

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

Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val
305 310 315 320
Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile
325 330 335
Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu
340 345 350
Asp Leu Lys
355

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2012/036456

International filing date (day/month/year)
04.05.2012

Priority date (day/month/year)
06.05.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/00 C07K14/21 C07K16/30

Applicant
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA...

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Brouns, Gaby

Telephone No. +31 70 340-0



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2012/036456

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☒ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-24</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-24</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-24</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

The application provides a recombinant immunotoxin (RIT) consisting of the following elements: (i) a specific disulphide stabilised Fv (dsFv) anti-mesothelin antibody; (ii) linked via ASGG to (iii) the furin cleavage site (FCS) derived from domain II of pseudomonas exotoxin A (PE); (iv) a flexible linker composed of GGS or GGSGGGS; (v) wild-type PE domain III or said domain comprising substitutions D406A, R432G, R467A, R490A, R513A, E548S, K590S and Q592A.

It is shown that introduction of the Gly-Gly-Ser linker between the FCS and PE domain III improves the cytotoxicity of said RIT when compared to the corresponding RIT lacking said flexible linker.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Claims 21 and 22 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rules 39.1(iv) and 67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Reference is made to the following documents:

- D1 WO 2009/032954 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; PASTAN IRA H [US]; WELDON JOHN [US];) 12 March 2009 (2009-03-12)
- D2 J. E. WELDON ET AL: "A protease-resistant immunotoxin against CD22 with greatly increased activity against CLL and diminished animal toxicity", BLOOD, vol. 113, no. 16, 16 April 2009, pages 3792-3800
- D3 CHOWDHURY P S ET AL: "Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro", NATURE BIOTECHNOLOGY vol. 17, 1 June 1999, p. 568-572

NOVELTY(Article 33(2) PCT)

The subject-matter of claim 1-24 appears not to be disclosed in the prior art (Article 33 (2) PCT).

INVENTIVE STEP(Article 33(3) PCT)

D1 (exp. 7) and D2 (p.3796, left-handed column, first full §) disclose SS1-PE-LR, which is understood to comprise mesothelin specific dsFv SS1, fused to the furin cleavage site (FCS) derived from domain II of PE, fused to PE domain III. The linker ASGG is used in SS1P and is considered also present in SS1-PE-LR derived thereof ([201]). From this the subject-matter of claim 1 differs in that a Gly-Gly-Ser linker is inserted between the FCS and PE domain III. The effect of this difference is that the cytotoxicity of said RIT is increased.

The problem to be solved may thus be seen as how to provide SS1-PE-LR with improved cytotoxicity. Although the solution as claimed may not be derived from the prior art, inventive step can not be acknowledged over the whole claimed scope (Article 33(3) PCT): anti-tumor activity and low non-specific toxicity is shown for SS1-LR/GGS, and additional low antigenicity is shown for SS1-LR/GGS/8M.

However, said activities are not shown for *every* anti-mesothelin antibody, comprising *every* linker L1, and *every* PE III domain comprising undefined substitutions.

INDUSTRIAL APPLICABILITY(Article 33(4) PCT)

The fusion proteins of the present invention and uses thereof appear industrially applicable (Article 33(4) PCT).

Re Item VII

Certain defects in the international application

M: the application only shows that a fusion protein comprising a *specific dsFv anti-mesothelin antibody* is suitable for use in an immunotoxin as claimed. It is not credible that all antibodies directed against mesothelin are suitable for use in an RIT of the present invention (D3). Moreover, the skilled person is not enabled by the present application nor by the prior art to construct the RIT of the invention comprising *any* antibody structure (*e.g.* a four subunit antibody)(Articles 5 and 6 PCT).

L1: the application uses a single linker consisting of the sequence ASGG but claims any linker between 1-10 amino acids. The linker used has particular properties, such as flexibility, which are not shared by every linker claimed. It is undue burden on the skilled person to identify *all* linkers that are suitable for use in the present invention (Articles 5 and 6 PCT).

The wording of the functional **PE** domain III in claims 1 and 23 (item (iii) 'residues of SEQ ID NO:1 which maintain immunogenicity of an epitope or subepitope' does not enable the skilled person to identify all such domains encompassed by said claims. In view of the description, ([101, 102]) the substitutions need to be more precisely defined by amino acid residue (both position in SEQ ID NO:1 and substitution by Ala, Gly, Ser or Glu). The resulting PE domain III needs to 'retain cytotoxic capability with reduced antigenicity compared to SEQ ID NO:1 (Articles 5 and 6 PCT).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

It appears that claim 24 should refer back to the polypeptide of claim 23 rather than to the vector of claim 19 (Article 6 PCT).



(51) International Patent Classification:

A61K 39/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/21 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2012/036456

(22) International Filing Date:

4 May 2012 (04.05.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/483,531 6 May 2011 (06.05.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES** [US/US]; 6011 Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, MD 20852-3804 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **PASTAN, Ira H.** [US/US]; 11710 Beall Mountain Road, Potomac, Maryland 20854 (US). **WELDON, John** [US/US]; 10624 Spotted

Horse Lane, Columbia, Maryland 21044 (US). **BEERS, Richard** [US/US]; 306 Russett Road, Rockville, Maryland 20853 (US).

(74) Agents: **MYCROFT, Frank J.** et al.; Kilpatrick Townsend & Stockton LLP, Two Embarcadero Center, Eighth Floor, San Francisco, California 94111-3834 (US).

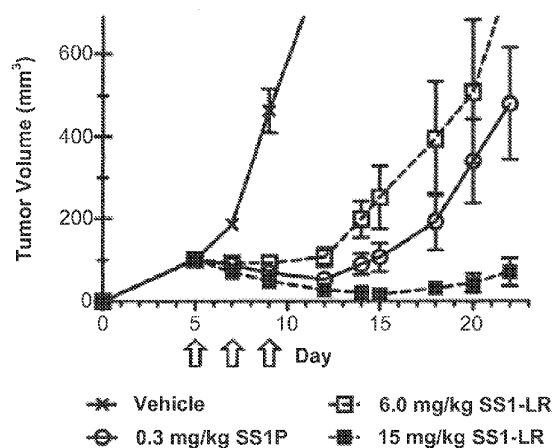
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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, 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, SM,

[Continued on next page]

(54) Title: RECOMBINANT IMMUNOTOXIN TARGETING MESOTHELIN

Figure 3



(57) Abstract: Mesothelin is a differentiation antigen present on the surface of ovarian cancers, mesotheliomas and several other types of human cancers. Because among normal tissues, mesothelin is only present on mesothelial cells, it represents a good target for antibody mediated delivery of cytotoxic agents. The present invention is directed to improved recombinant immunotoxins comprising anti-mesothelin antibodies, including Fv molecules with particularly high affinity for mesothelin, and a Pseudomonas Exotoxin moiety which has been modified to reduce its immunogenicity and protease sensitivity and providing a better cytotoxicity for cells which express mesothelin. The RITs are well-suited for the treatment of cancers of the ovary, stomach, squamous cells, mesotheliomas and other malignant cells expressing mesothelin.



TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, — *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 77867-838131	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2012/036456	International filing date (<i>day/month/year</i>) 04/05/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 06/05/2011
Applicant THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA...		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 3
- ☒ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/036456

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 C07K14/21 C07K16/30
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/032954 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; PASTAN IRA H [US]; WELDON JOHN [US];) 12 March 2009 (2009-03-12) example 7	1-24
X	----- J. E. WELDON ET AL: "A protease-resistant immunotoxin against CD22 with greatly increased activity against CLL and diminished animal toxicity", BLOOD, vol. 113, no. 16, 16 April 2009 (2009-04-16), pages 3792-3800, XP55035346, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2008-08-173195 page 3796, left-hand column, paragraph 1 ----- -/-	1-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2012

Date of mailing of the international search report

23/08/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brouns, Gaby

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/036456

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/032022 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; PASTAN IRA H [US]; BEERS RICHARD [US]) 17 March 2011 (2011-03-17) examples 1-4 claims 23, 35, 46 -----	1-24
A	HANSEN JOHANNA K ET AL: "A Recombinant Immunotoxin Targeting CD22 With Low Immunogenicity, Low Nonspecific Toxicity, and High Antitumor Activity in Mice", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 33, no. 3, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 297-304, XP009143548, ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/CJI.0B013E3181CD1164 figure 1; table 1 -----	1-24
A	CHOWDHURY P S ET AL: "IMPROVING ANTIBODY AFFINITY BY MIMICKING SOMATIC HYPERMUTATION IN VITRO", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 17, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 568-572, XP000918985, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/9872 -----	1-22
A	S YANG ET AL: "Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition", GENE THERAPY, vol. 15, no. 21, 22 May 2008 (2008-05-22), pages 1411-1423, XP55035564, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2008.90 figure 1 -----	1-24
A	GOYAL A ET AL: "INCLUSION OF A FURIN-SENSITIVE SPACER ENHANCES THE CYTOTOXICITY OF RIBOTOXIN RESTRICTION CONTAINING RECOMBINANT SINGLE-CHAIN IMMUNOTOXINS", BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 345, no. PART 02, 15 January 2000 (2000-01-15), pages 247-254, XP001008585, ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/0264-6021:3450247 figure 1 ----- -/--	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/036456

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	W. LIU ET AL: "Recombinant immunotoxin engineered for low immunogenicity and antigenicity by identifying and silencing human B-cell epitopes", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 29, 2 July 2012 (2012-07-02) , pages 11782-11787, XP55035379, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1209292109 page 11787, left-hand column, last paragraph -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/036456

Patent document cited in search report			Publication date		Patent family member(s)			Publication date	
WO 2009032954	A1	12-03-2009	AU	2008296194	A1		12-03-2009		
			CA	2698357	A1		12-03-2009		
			EP	2197903	A1		23-06-2010		
			US	2010215656	A1		26-08-2010		
			WO	2009032954	A1		12-03-2009		

WO 2011032022	A1	17-03-2011	AU	2010292069	A1		05-04-2012		
			CA	2773665	A1		17-03-2011		
			EP	2475398	A1		18-07-2012		
			WO	2011032022	A1		17-03-2011		

 SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 21-11-13	
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/00	
(71) Solicitante(s): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES	
(72) Inventor(es): PASTAN, Ira, H.; WELDON, John y BEERS, Richard.	
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/483,531 06-05-11 US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 06-12-13	(87) Publicación internacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 04-05-12 No. de solicitud: PCT/US2012/036456	Fecha: 15-11-12 No. Publicación: WO 2012/154530 A1
(54) Título: INMUNOTOXINA RECOMBINANTE DIRIGIDA A LA MESOTELINA.	
(57) Resumen - Reivindicación(es): Resumen.- La mesotelina es un antígeno de diferenciación presente en la superficie de los cánceres de ovario, mesoteliomas y varios otros tipos de cánceres humanos. Puesto que entre los tejidos normales, la mesotelina está presente solo en las células mesoteliales, representa un buen blanco para la entrega de agentes citotóxicos mediada por anticuerpo. La presente invención está dirigida a mejores inmunotoxinas recombinantes que comprenden anticuerpos anti-mesotelina, incluyendo moléculas Fv con afinidad particularmente alta por la mesotelina, y una mitad de Exotoxina de Pseudomonas, que ha sido modificada para reducir su inmunogenicidad y la sensibilidad a la proteasa, y proporcionan una mejor citotoxicidad para las células que expresan la mesotelina. Las RIT son adecuadas para el tratamiento de cánceres de ovarios, estómago, células escamosas, mesoteliomas y otras células malignas que expresan la mesotelina. Sector: Química Farmacéutica, específicamente inmunotoxinas recombinantes que comprenden anticuerpos anti-mesotelina, composiciones farmacéuticas que los comprenden. Útiles en el tratamiento del cáncer de ovario, estomago, células escamosas, mesoteliomas y otras células malignas que expresan la mesotelina.	

 SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 21-11-13	
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/00	
(71) Solicitante(s): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES	
(72) Inventor(es): PASTAN, Ira, H.; WELDON, John y BEERS, Richard.	
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/483,531 06-05-11 US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 06-12-13	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 04-05-12 No. de solicitud: PCT/US2012/036456	Fecha: 15-11-12 No. publicación: WO 2012/154530 A1
(54) Título: INMUNOTOXINA RECOMBINANTE DIRIGIDA A LA MESOTELINA.	



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JUNE 07, 2011

PTAS

FRANK J. MYCROFT, ESQ.
KILPATRICK TOWNSEND & STOCKTON LLP
TWO EMBARCADERO CENTER, 8TH FLOOR
SAN FRANCISCO, CA 94111-3834



501557377

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM 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 EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 06/07/2011

REEL/FRAME: 026403/0900
NUMBER OF PAGES: 7

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: 77867-803685 (603000US)

ASSIGNOR:
PASTAN, IRA H.

DOC DATE: 05/16/2011

ASSIGNOR:
WELDON, JOHN

DOC DATE: 05/16/2011

ASSIGNOR:
BEERS, RICHARD

DOC DATE: 05/16/2011

ASSIGNEE:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES
OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF
HEALTH AND HUMAN SERVICES
OFFICE OF TECHNOLOGY, TRANSFER
6011 EXECUTIVE BLVD., SUITE 325
ROCKVILLE, MARYLAND 20852-3804

APPLICATION NUMBER: 61483531

FILING DATE: 05/06/2011

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: RECOMBINANT IMMUNOTOXIN TARGETING MESOTHELIN

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

06/07/2011
501557377Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT												
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT												
CONVEYING PARTY DATA													
<table border="1"><thead><tr><th>Name</th><th>Execution Date</th></tr></thead><tbody><tr><td>Ira H. Pastan</td><td>05/16/2011</td></tr><tr><td>John Weldon</td><td>05/16/2011</td></tr><tr><td>Richard Beers</td><td>05/16/2011</td></tr></tbody></table>		Name	Execution Date	Ira H. Pastan	05/16/2011	John Weldon	05/16/2011	Richard Beers	05/16/2011				
Name	Execution Date												
Ira H. Pastan	05/16/2011												
John Weldon	05/16/2011												
Richard Beers	05/16/2011												
RECEIVING PARTY DATA													
<table border="1"><tr><td>Name:</td><td>The Government of the United States of America as Represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services</td></tr><tr><td>Street Address:</td><td>Office of Technology, Transfer</td></tr><tr><td>Internal Address:</td><td>6011 Executive Blvd., Suite 325</td></tr><tr><td>City:</td><td>Rockville</td></tr><tr><td>State/Country:</td><td>MARYLAND</td></tr><tr><td>Postal Code:</td><td>20852-3804</td></tr></table>		Name:	The Government of the United States of America as Represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services	Street Address:	Office of Technology, Transfer	Internal Address:	6011 Executive Blvd., Suite 325	City:	Rockville	State/Country:	MARYLAND	Postal Code:	20852-3804
Name:	The Government of the United States of America as Represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services												
Street Address:	Office of Technology, Transfer												
Internal Address:	6011 Executive Blvd., Suite 325												
City:	Rockville												
State/Country:	MARYLAND												
Postal Code:	20852-3804												
PROPERTY NUMBERS Total: 1													
<table border="1"><thead><tr><th>Property Type</th><th>Number</th></tr></thead><tbody><tr><td>Application Number:</td><td>61483531</td></tr></tbody></table>		Property Type	Number	Application Number:	61483531								
Property Type	Number												
Application Number:	61483531												
CORRESPONDENCE DATA													
Fax Number: (415)576-0300 <i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>													
Phone: (925) 472-5000													
Email: kheldt@kilpatricktownsend.com													
Correspondent Name: Frank J. Mycroft, Esq.													
Address Line 1: Kilpatrick Townsend & Stockton LLP													
Address Line 2: Two Embarcadero Center, 8th Floor													
Address Line 4: San Francisco, CALIFORNIA 94111-3834													
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	77867-803685 (603000US)												
NAME OF SUBMITTER:	Kimberly Heldt												

QP \$40.00 61483531

Total Attachments: 5

source=803685_Assignment_Pastan_Weldon_Beers_to_NIH#page1.tif

source=803685_Assignment_Pastan_Weldon_Beers_to_NIH#page2.tif

source=803685_Assignment_Pastan_Weldon_Beers_to_NIH#page3.tif

source=803685_Assignment_Pastan_Weldon_Beers_to_NIH#page4.tif

source=803685_Assignment_Pastan_Weldon_Beers_to_NIH#page5.tif

ASSIGNMENT

JOINT

WHEREAS, We, Ira H. Pastan, a citizen of the United States, residing in Potomac, Maryland, John Weldon, a citizen of the United States, residing in Columbia, Maryland, and Richard Beers, a citizen of the United States, residing in Rockville, Maryland, employees of the Department of Health and Human Services at the time the invention was made, have invented (title of invention): RECOMBINANT IMMUNOTOXIN TARGETING MESOTHELIN, for which an application to the Commissioner for Patents for grant of Letters Patents of the United States of America has been executed by the undersigned

☐ on (date(s) Declaration signed):

☒ is identified as U.S. Patent Application:
Serial No. 61/483,531

Filed May 6, 2011; and

WHEREAS, the conditions under which said invention was made are such as to entitle the Government of the United States of America under Paragraph 1(a) of Executive Order 10096, to the entire right, title, and interest herein, both domestic and foreign; and

WHEREAS, the Government of the United States of America is desirous of acquiring all domestic and foreign right, title, and interest in the aforesaid invention described in the aforesaid application for Letters Patent of the United States of America; and

NOW, THEREFORE, to all whom it may concern, be it known that for and in consideration of the premises and other valuable considerations, we the undersigned, have sold, assigned, and transferred and by these presents do sell, assign, and transfer unto The Government of the United States of America as represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services (hereinafter THE GOVERNMENT), and his successors, the full and exclusive right, title, and interest throughout the United States of America, its territories and dependencies, and within each and every foreign country in which THE GOVERNMENT elects to file the invention described in the aforesaid application for Letters Patent of the United States of America, and all Letters Patents and Registrations which may be granted on the same in the United States of America and all countries throughout the world, and to claim the priority from the application as provided by the Paris Convention, or of any division, renewal, continuation in whole or in part, substitution, conversion, reissue, prolongation or extension thereof.

AND, we hereby authorize and request the Commissioner for Patents to issue said Letters Patent to THE GOVERNMENT as assignee of the entire right, title, and interest in and to the same throughout the United States of America, its territories and dependencies, and within each and every foreign country in which THE GOVERNMENT elects to file, for the sole use for the full term or terms for which said Letters Patent and Registrations may be granted thereon, or of any division, renewal, continuation in whole or in part, substitution, conversion, reissue, prolongation or extension thereof which may be granted as fully and entirely as the same would have been held by us, had this assignment not been made;

AND, we hereby warrant that there are no outstanding assignments, grants, liens, encumbrances, or agreements either written, oral, or implied with respect to the aforesaid application for Letters Patent which will impair, diminish, limit, or abridge the interest herein conveyed at the time of the execution of this instrument by us;

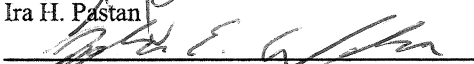
AND, we hereby agree to execute any and all applications for Letters Patent in the United States of America and foreign countries, and to furnish and deliver to the Secretary, Department of Health and Human Services, upon request, all data and documents, and to execute any papers which may be necessary for the prosecution of any application or applications of Letters Patent or for THE GOVERNMENT to exercise its rights granted hereunder, including communicating to THE GOVERNMENT, its representatives or agents, any facts relating to said invention, including evidence for interference purposes, or for other proceedings, whenever requested, to testify in any interference or other proceedings, whenever requested, and to execute and deliver on request all lawful papers required to make any of the foregoing provisions effective, and likewise make these provisions binding upon our heirs, legal representatives, administrators and assigns, and we shall assist THE GOVERNMENT in every way as may be requested in protecting said invention, provided that any expense of extending such assistance shall be paid by THE GOVERNMENT.

The undersigned hereby grants THE GOVERNMENT or the law firm of Townsend and Townsend and Crew LLP, the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document.

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignors have signed their names on the dates indicated.


Ira H. Pastan

5/16/2011
(date)


John Weldon

5/16/2011
(date)


Richard Beers

5/16/2011
(date)

STATE OF Maryland)

COUNTY OF Montgomery)

UNITED STATES OF AMERICA

On May 16, 2011, before me, Anna Schombert, Notary Public (here insert name and title of the officer), personally appeared Ira Pastan, personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, execute the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Anna Schombert
my commission expires 10/31/2011

(Seal)

STATE OF Maryland)
)
COUNTY OF Montgomery)

UNITED STATES OF AMERICA

On May 16, 2011, before me, Ann Schombert, Notary Public (here insert name and title of the officer), personally appeared Richard Beers, personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, execute the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Ann Schombert
My commission expires 10/31/2013

(Seal)

STATE OF Maryland)

COUNTY OF Montgomery)

UNITED STATES OF AMERICA

On May 16, 2011, before me Ann Schombert, Notary Public (here insert name and title of the officer), personally appeared John E. Weldon, personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, execute the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Ann Schombert
My commission expires 10/31/2011

(Seal)

TRADUCCION OFICIAL No. 2013-11-19-660
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Sello
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Subsecretario de Comercio para Propiedad Intelectual y
Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

07 de junio de 2011

PTAS

501557377

FRANK J. MYCROFT, ESQ
KILPATRICK TOWNSEND & STOCKTON LLP
TWO EMBARCADERO CENTER, 8TH FLOOR
SAN FRANCISCO, CA 94111-3834

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
NOTIFICACION DE REGISTRO DE UN DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO REGISTRADO POR LA DIVISION DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA MICROFILMADA COMPLETA ESTA DISPONIBLE EN LA OFICINA DE BUSQUEDA DE TRASPASOS BAJO LOS NUMEROS DE ROLLO Y MICROFICHA CUYAS REFERENCIAS SE INDICAN A CONTINUACION.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION. LA INFORMACION QUE ESTA NOTIFICACION DE REGISTRO CONTIENE REFLEJA LOS DATOS QUE FIGURAN EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED ENCUENTRA ERRORES O TIENE ALGUNA PREGUNTA RELACIONADA CON ESTA NOTIFICACION, PUEDE COMUNICARSE CON EL EMPLEADO CUYO NOMBRE FIGURA EN ESTA NOTIFICACION EN EL TELEFONO 571-272-3350. POR FAVOR ENVIE SU SOLICITUD DE CORRECCION A: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT DIVISION SERVICES, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 06/07/2011

ROLLO / MICROFICHA: 026403 / 0900

NUMERO DE PAGINAS: 7

RESUMEN: TRASPASO DE LOS INTERESES DEL CEDENTE(S) (VER DOCUMENTO PARA
DETALLES). NUMERO DE EXPEDIENTE: 77867-803685 (603000US)

CEDENTE:

PASTAN, IRA H.

FECHA DEL DOCUMENTO: 05/16/2011

CEDENTE:

WELDON, JOHN

FECHA DEL DOCUMENTO: 05/16/2011

CEDENTE:

BEERS, RICHARD

FECHA DEL DOCUMENTO: 05/16/2011

CESIONARIO:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA
AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT
OF HEALTH AND HUMAN SERVICES OFFICE OF TECHNOLOGY, TRANSFER
6011 EXECUTIVE BLVD., SUITE 325
ROCKVILLE, MARYLAND 20852-3804

NUMERO DE SOLICITUD: 61483531

FECHA DE PRESENTACIÓN: 05 / 06 / 2011

NUMERO DE PATENTE:

FECHA DE EXPEDICIÓN:

TITULO: INMUNOTOXINA RECOMBINANTE DIRIGIDA A LA MESOTELINA

SUCURSAL DE SERVICIOS DE TRASPASOS

DIVISION DE REGISTROS PUBLICOS

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	06 / 07 / 2011
Versión Hoja Estilo v1.1	501557377
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Ira H. Pastan	05/16/2011
John Weldon	05/16/2011
Richard Beers	05/16/2011

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	The Government of the United States of America Representado por el Secretario del Department of Health and Human Services
Dirección:	Office of Technology, Transfer
Dirección Interna:	6011 Executive Blvd., Suite 325
Ciudad:	Rockville
Estado/País	MARYLAND
Código Postal	20852-3804
Total NUMEROS DE PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número Solicitud:	61483531

DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(415)576-0300
<i>La correspondencia se enviará vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	
Teléfono:	(925) 472-5000
Email:	kheldt@kilpatricktownsend.com
Nombre Corresponsal:	Frank J. Mycroft, Esq.
Línea Dirección 1:	Kilpatrick Townsend & Stockton LLP
Línea Dirección 2:	Two Embarcadero Center, 8th Floor
Línea Dirección 4:	San Francisco, CALIFORNIA 94111-3834
NUMERO EXPEDIENTE:	77867-803685 (603000US)
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Kimberly Heldt

Total Anexos: 5

fuelle=803685_Traspaso_Pastan_Weldon_Beers_a_NIH#página1.tif
--

fuelle=803685_Traspaso_Pastan_Weldon_Beers_a_NIH#página2.tif
--

fuelle=803685_Traspaso_Pastan_Weldon_Beers_a_NIH#página3.tif
--

fuelle=803685_Traspaso_Pastan_Weldon_Beers_a_NIH#página4.tif
--

fuelle=803685_Traspaso_Pastan_Weldon_Beers_a_NIH#página5.tif
--

CONJUNTO

TRASPASO

POR CUANTO, Nosotros, Ira H. Pastan, ciudadano de los Estados Unidos, residente en Potomac, Maryland, John Weldon, ciudadano de los Estados Unidos, residente en Columbia, Maryland, y Richard Beers, ciudadano de los Estados Unidos, residente en Rockville, Maryland, empleados del Department of Health and Human Services en el momento en que se hizo la invención, hemos inventado (título de la invención): INMUNOTOXINA RECOMBINANTE DIRIGIDA A LA MESOTELINA, para la cual se ha suscrito una solicitud ante el Comisionado de Patentes para que otorgue Patente de Invención de los Estados Unidos de América

☐ en (fecha(s) en que se firmó la Declaración):

☒ se identifica como Solicitud de Patente de los EE.UU.: No Serial 61/485,531

Presentada el 6 de mayo de 2011; y

POR CUANTO, las condiciones bajo las cuales se hizo dicha invención son tales como para facultar al Gobierno de los Estados Unidos de America bajo el Párrafo 1(a) de la Orden Ejecutiva 10096, a todo el derecho, título e interés en el presente, tanto nacional como extranjero; y

POR CUANTO, El Gobierno de los Estados Unidos de America desea adquirir todo el derecho, título e interés nacional en la invención anteriormente descrita en la solicitud anterior para Patente de Invención de los Estados Unidos de América; y

AHORA, POR LO TANTO, a todos a quienes concierna, sépase que por y en consideración de las premisas y otras consideraciones valiosas, nosotros el suscrito, hemos vendido, traspasado y transferido y por el presente vendemos, traspasamos y transferimos al Gobierno de los Estados Unidos de América representado por el Secretario del Department of Health and Human Services (en adelante EL GOBIERNO), y a sus sucesores, todo el derecho, título e interés en los Estados Unidos de America, sus territorios y dependencias, y dentro de cada y todo país extranjero en el cual EL GOBIERNO desea presentar la invención descrita en la solicitud anteriormente mencionada para Patente de Invención de los Estados Unidos de América, y todas las Patentes de Invención y Registros que pudiesen otorgarse sobre la misma en los Estados Unidos de América y todos los países del mundo, y reivindicar la prioridad de la solicitud según dispone la Convención de París, o

de una división, renovación, continuación en todo o en parte, sustitución, conversión, reexpedición, prolongación o extensión de la misma.

Y, por el presente autorizamos y le solicitamos al Comisionado de Patentes que expida dicha Patente de Invención AL GOBIERNO como cesionario de todo el derecho, título e interés en y de la misma en los Estados Unidos de América, sus territorios y dependencias, y dentro de cada y todo país extranjero en el cual EL GOBIERNO decida presentar, para su solo uso para todo el término o términos para el cual dicha Patentes de Invención y Registros pudiesen otorgarse sobre la misma, o de una división, renovación, continuación en todo o en parte, sustitución, conversión, reexpedición, prolongación o extensión de la misma que pudiese otorgarse tan completa y enteramente como la misma hubiese sido tenida por nosotros, si este traspaso no se hubiese hecho;

Y, por el presente garantizamos que no hay traspasos, otorgamientos, gravámenes, cargas, o contratos pendientes escritos, orales o implícitos respecto a la solicitud anteriormente mencionada para Patente de invención que afecte, disminuya, limite o resuma el interés en el presente traspasado en el momento de la suscripción de este instrumento por nosotros;

Y, por el presente acordamos suscribir cualquiera y todas las solicitudes para Patente de Invención en los Estados Unidos de América y países extranjeros, y promocionar y entregarle al Secretario del Department of Health and Human Services, cuando se solicite, todos los datos y documentos, y suscribir cualquier papel que pudiese ser necesario para el procesamiento de cualquier solicitud o solicitudes de Patente de invención o para EL GOBIERNO para ejercer sus derechos otorgados bajo el presente, incluyendo comunicarle AL GOBIERNO, sus representantes o agentes, cualquier hecho relacionado con dicha invención, incluyendo evidencia para fines de interferencia, o para otros procedimientos, cuando sean solicitados, testificar en cualquier interferencia u otro procedimiento, cuando se solicite, y suscribir y entregar cuando se solicite todos los papeles legítimos requeridos para hacer cualquier disposición anterior efectiva, y de igual modo hacer estas disposiciones vinculantes sobre nuestros herederos, representantes legales, administradores y cesionarios, y le ayudaremos AL GOBIERNO en todo según sea solicitado para proteger dicha invención, siempre y cuando que cualquier gasto de extender dicha ayuda sea pagado por EL GOBIERNO.

El suscrito por el presente le otorga AL GOBIERNO o a la firma de abogados Townsend and Townsend and Crew LLP, el poder para insertar en este Traspaso cualquier identificación

adicional que sea necesaria o deseable con el fin de cumplir con las normas de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos para registro de este documento.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, los Cedentes han firmado en las fechas indicadas.

(firma: ilegible)	5 / 16 / 2011
Ira H. Pastan	(fecha)
(firma: ilegible)	5 / 16 / 2011
John Weldon	(fecha)
(firma: ilegible)	5 / 16 / 2011
Richard Beers	(fecha)

ESTADO DE MARYLAND)
CONDADO DE MONTGOMERY)
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

El 16 de mayo de 2011, ante mí, Ann Schombert, Notario Público (insertar acá nombre y cargo del funcionario), compareció personalmente Ira Pastan, a quien conozco personalmente (o me demostró con base en evidencia satisfactoria) que es la persona(s) cuyo nombre(s) está suscrito en el instrumento adjunto y reconoció ante mí que él/ella/ellos firmó el mismo como persona(s) autorizada, y que por medio de su firma(s) sobre el instrumento la persona(s), o la entidad en nombre de quien la persona(s) actúo, firmó el documento.

TESTIFICA mi firma y sello oficial.

(Sello)

Firma (ilegible)

Mi Nombramiento Expira el 10 / 31 / 2011

ESTADO DE MARYLAND)
CONDADO DE MONTGOMERY)
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

El 16 de mayo de 2011, ante mí, Ann Schombert, Notario Público (insertar acá nombre y cargo del funcionario), compareció personalmente Richard Beers, a quien conozco personalmente (o me demostró con base en evidencia satisfactoria) que es la persona(s) cuyo nombre(s) está suscrito en el instrumento adjunto y reconoció ante mí que él/ella/ellos firmó el mismo como persona(s) autorizada, y que por medio de su firma(s) sobre el instrumento la persona(s), o la entidad en nombre de quien la persona(s) actuó, firmó el documento.

TESTIFICA mi firma y sello oficial.

(Sello)

Firma (ilegible)

Mi Nombramiento Expira el 10 / 31 / 2011

ESTADO DE MARYLAND)
CONDADO DE MONTGOMERY)
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

El 16 de mayo de 2011, ante mí, Ann Schombert, Notario Público (insertar acá nombre y cargo del funcionario), compareció personalmente John E. Weldon, a quien conozco personalmente (o me demostró con base en evidencia satisfactoria) que es la persona(s) cuyo nombre(s) está suscrito en el instrumento adjunto y reconoció ante mí que él/ella/ellos firmó el mismo como persona(s) autorizada, y que por medio de su firma(s) sobre el instrumento la persona(s), o la entidad en nombre de quien la persona(s) actuó, firmó el documento.

TESTIFICA mi firma y sello oficial.

(Sello)

Firma (ilegible)

Mi Nombramiento Expira el 10 / 31 / 2011

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 20 de noviembre de 2013, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO