

CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y FÁRMACO DE ERIBULINA ANTI-
MESOTELINA Y MÉTODOS DE USO

[0001] La presente divulgación reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 62/932,373, presentada el 7 de noviembre de 2019, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

[0002] La presente divulgación se refiere a anticuerpos anti-mesotelina y a fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como a conjugados tales como conjugados de anticuerpo y fármaco (los ADC, forma siglada de *antibody-drug conjugate*), por ejemplo, los que comprenden eribulina, y a su uso en el tratamiento y diagnóstico de cánceres que expresan mesotelina y/o que son susceptibles de tratamiento mediante la desorganización de la tubulina o mediante la administración de una composición divulgada en el presente documento.

[0003] El cáncer se encuentra entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en 2012. Las causas más comunes de muerte por cáncer son los cánceres de: pulmón (1.59 millones de muertes); hígado (745,000 muertes); estómago (723,000 muertes); colorrectal (694,000 muertes); mama (521,000 muertes) y esófago (400,000 muertes). Se espera que la cantidad de nuevos casos de cáncer aumente en aproximadamente un 70 % durante las próximas dos décadas, a aproximadamente 22 millones de nuevos casos de cáncer por año (World Cancer Report 2014).

[0004] La mesotelina, una proteína de superficie celular anclada por glucosilfosfatidilinositol (GPI), es una

diana atractiva para la terapia del cáncer basada en anticuerpos, debido a su alta expresión en diversos tipos de cáncer, incluido el mesotelioma, el cáncer de ovario y los adenocarcinomas de páncreas (Tang et al. (2013) Anticancer Agents Med. Chem. 13(2):276-80). Aunque se carece de una comprensión completa de las funciones biológicas de la mesotelina, dado que los ratones genosuprimidos para la mesotelina no muestran ningún fenotipo detectable, se ha sugerido que la mesotelina desempeña un papel en la adhesión y metástasis tumorales (Bera y Pastan (2000) Mol. Cell Biol. 20(8):2902-6; Rump et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(10):9190-8). Además, se cree que la mesotelina confiere resistencia a determinadas formas de quimioterapia y contribuye a la progresión tumoral al tener un efecto proliferativo sobre las células (Bharadwaj et al. (2011) Mol. Cancer. 10:106; Li et al. (2008) Mol. Cancer Ther. 7(2):286-96).

[0005] Estudios recientes han demostrado que la mesotelina puede actuar como un regulador principal de la transición epitelial-mesenquimatosa (TEM), un proceso estrechamente asociado con la metástasis y la recidiva del cáncer (He et al. (2017). Mol Cancer. 16:63). Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la inhibición de la mesotelina, por ejemplo, la unión por un anticuerpo anti-mesotelina, un fragmento de unión a antígeno y/o un ADC, puede reducir la TEM al inducir el proceso inverso, la transición mesenquimatosa epitelial (TME), a través de la supresión de la señalización del TGF- β (factor de crecimiento y transformación beta). Por el contrario, se cree que la sobreexpresión de mesotelina puede dirigir a la TEM a través de la inducción de fenotipos de tipo células madre cancerosas asociados con la progresión tumoral y una mala respuesta al

tratamiento (He *et al.* (2017). *Mol Cancer*. 16:63; Koyama *et al.* (2017). *J. Clin. Invest.* 127(4): 1254-1270).

5 **[0006]** Un reto habitual en la terapia del cáncer es que el limitado índice terapéutico de los quimioterapéuticos da como resultado una toxicidad significativa en los tejidos normales, lo que limita su utilidad terapéutica. Un enfoque para lograr una mayor especificidad para dirigirse a las células cancerosas es mediante el uso de anticuerpos para producir efectos citotóxicos en las células que expresan determinados antígenos específicos de tumor, sin afectar a las células normales que expresan niveles mucho más bajos o que no expresan tales antígenos (Awwad *et al.* *Pharmaceutics* (2018) 10(3); Lambert y Berkenblit (2018) 69: 191-207). Dicho direccionamiento específico de tumor puede aprovecharse tanto para aumentar la actividad antitumoral como para disminuir la citotoxicidad de los agentes terapéuticos inespecíficos. Los anticuerpos que se dirigen a antígenos específicos de tumor pueden proporcionar efectos citotóxicos a través de una diversidad de mecanismos, que incluyen inhibir la actividad biológica del antígeno, suscitar una actividad efectora inmunitaria y/o inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Hendrinks *et al.* *International Review of Cell and Molecular Biology* (2017); *Therapeutic Antibody Engineering* (2012): 163-196, 459-595).

25 **[0007]** La selección de antígenos específicos de tumor para un enfoque terapéutico basado en anticuerpos puede implicar la expresión específica de un antígeno por parte de las células tumorales y la destrucción sólida de las células tumorales que expresan el antígeno. Se ha descubierto que varios cánceres humanos expresan altos niveles de mesotelina, incluyendo el cáncer de pulmón, el cáncer de

ovario, el cáncer de páncreas y el cáncer de estómago (Hassan *et al.* Eur. J. Cancer (2008) 44(1): 46-53; Hassan *et al.* J. Clin. Oncol. (2016) 34(34): 4171-4179). La expresión de mesotelina también se ha descubierto en cánceres resistentes a los fármacos, tales como los cánceres de pulmón con mutaciones de KRAS y STK11 con mala respuesta clínica a la inmunoterapia de bloqueo de puntos de control, y el cáncer gástrico negativo para HER2. Adicionalmente, se ha informado una correlación entre la expresión de mesotelina y la supervivencia global de pacientes con adenocarcinoma de pulmón y de pacientes con metástasis de cáncer gástrico, lo que sugiere que una expresión alta de mesotelina puede ser un factor pronóstico de un peor resultado clínico (Kachala *et al.* (2014) Clin. Cancer. Res. 20(4): 1020-1028; Han *et al.* (2017) J. Pathol. Transl. Med. 51(2): 122-128). La prevalencia de la expresión de la mesotelina en los cánceres humanos y su asociación con un mal resultado clínico hacen que la mesotelina sea una diana potencial para los enfoques de suministro de fármacos específicos de antígenos tumorales, por ejemplo, un enfoque mediado por anticuerpos. También se han explorado anticuerpos conjugados con compuestos citotóxicos, tales como quimioterapéuticos, para potenciar la actividad destructora de células del suministro de fármacos basados en anticuerpos a las células tumorales. No obstante, sigue existiendo la necesidad de proporcionar anticuerpos y/o ADC adecuados que ofrezcan una combinación de un direccionamiento eficaz al tumor, efectos específicos, destrucción por vecindad y/o efectos inespecíficos reducidos.

[0008] La eribulina es un análogo sintético del compuesto macrocíclico halicondrina B, que se ha demostrado

anteriormente que es un potente inhibidor de la polimerización de tubulina, del ensamblaje de microtúbulos y de la hidrólisis de GTP dependiente de tubulina. La tubulina forma proteínas del citoesqueleto filamentosas dinámicas llamadas microtúbulos, que están implicadas en una diversidad de funciones celulares vitales, que incluyen la migración y el transporte intracelulares, la señalización celular, el mantenimiento de la forma celular y la división celular. La rápida tasa de división de las células cancerosas las hace particularmente sensibles a la obstrucción de la función de la tubulina. Así pues, la halicondrina B y la eribulina han demostrado notables actividades antineoplásicas *in vitro* e *in vivo* (Tan *et al.* (2009) Clin Cancer Res. 15(12): 4213-4219; Vahdat *et al.* (2009) J. Clin. Oncol. 27(18): 2954-2961). La sal mesilato de eribulina (mesilato de eribulina) se comercializa actualmente con la marca comercial Halaven™ para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico resistente.

[0009] Si bien se han informado usos de la eribulina en la técnica, incluso en el contexto de un ADC, sigue existiendo la necesidad de suministrar mejor la eribulina de manera dirigida a tejidos particulares, por ejemplo, tejidos cancerosos que expresan mesotelina. Asimismo, sigue existiendo la necesidad en la técnica de anticuerpos mejorados que se unan a la mesotelina con propiedades superiores, por ejemplo, con respecto a la unión al antígeno y/o la capacidad de suministrar de forma eficaz cargas útiles, tales como la eribulina, a una célula o tejido diana que exprese mesotelina.

[0010] En diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona, en parte, anticuerpos y fragmentos

de unión a antígeno novedosos que pueden utilizarse solos, unidos a uno o más agentes adicionales (por ejemplo, como los ADC) o como parte de una macromolécula más grande (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, anticuerpo multiespecífico, solo o como un anticuerpo multiespecífico unido a una carga útil en formato de ADC) y administrarse como parte de composiciones farmacéuticas o terapias de combinación. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son humanizados. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno contienen secuencias mínimas obtenidas de una inmunoglobulina no humana y conservan la reactividad de un anticuerpo no humano al tiempo que son menos inmunogénicos en el ser humano. En determinadas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes humanos con cáncer.

[0011] La presente divulgación se refiere más específicamente, en diversas realizaciones, a anticuerpos y compuestos de conjugados de anticuerpo y fármaco que son capaces de unirse y/o de destruir células tumorales. En diversas realizaciones, los compuestos también pueden internalizarse en una célula diana tras la unión. Se divulgan compuestos de ADC que comprenden un enlazador que conecta una fracción de fármaco de eribulina a una fracción de anticuerpo. Una fracción de anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a antígeno.

[0012] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden

las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (HCDR1),
SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y SEQ ID NO: 3 (HCDR3); y tres regiones
determinantes de complementariedad de cadena ligera (las
LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ
5 ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) y SEQ ID NO: 6 (LCDR3),
según lo definido por el sistema de numeración de Kabat
(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest
(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y
1991))); o tres regiones determinantes de complementariedad
10 de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de
aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2)
y SEQ ID NO: 9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de
complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden
las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (LCDR1),
15 SEQ ID NO: 11 (LCDR2) y SEQ ID NO: 12 (LCDR3), según lo
definido por el sistema de numeración IMGT (International
ImMunoGeneTics Information System (IMGT®)).

[0013] En algunas realizaciones, un anticuerpo o
fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente
20 documento comprende tres regiones determinantes de
complementariedad de cadena pesada (las HCDR) de una región
variable de cadena pesada que comprende una secuencia de
aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y tres regiones determinantes
de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) de una
25 región variable de cadena ligera que comprende una secuencia
de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

[0014] En algunas realizaciones, un anticuerpo o
fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente
documento es un anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de
30 unión a antígeno. En diversas realizaciones, el anticuerpo
o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable

de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, o secuencias que son al menos el 90 % idénticas a las secuencias divulgadas. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región constante de cadena ligera kappa de Ig humana que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18.

15 **[0015]** En diversas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 19 (HCDR1), SEQ ID NO: 20 (HCDR2) y SEQ ID NO: 21 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 22 (LCDR1), SEQ ID NO: 23 (LCDR2) y SEQ ID NO: 24 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 25 (HCDR1), SEQ ID NO: 26 (HCDR2) y SEQ ID NO: 27 (HCDR3); y tres regiones determinantes de

complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 28 (LCDR1), SEQ ID NO: 29 (LCDR2) y SEQ ID NO: 30 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT.

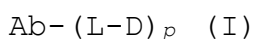
[0016] En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 31, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 33, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 34. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 35, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 36.

[0017] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoespecífico o fragmento de unión a antígeno, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno, o un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión a antígeno. En algunas

realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un fragmento variable monocatenario (scFv), o un fragmento Fab.

[0018] En diversas realizaciones, el anticuerpo o
5 fragmento de unión a antígeno está conjugado con un agente
terapéutico, por ejemplo, una o más moléculas pequeñas y/o
anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno adicionales. En
algunas realizaciones, el agente terapéutico es la
eribulina. En algunas realizaciones, el anticuerpo o
10 fragmento de unión a antígeno es 345A12-HC15-LC4.

[0019] En diversas realizaciones, un ADC divulgado
en el presente documento comprende la Fórmula (I):



en donde

15 Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en
donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz
de unirse a la mesotelina y comprende tres regiones
determinantes de complementariedad de cadena pesada (las
HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ
20 ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y SEQ ID NO: 3 (HCDR3);
y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena
ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de
aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2)
y SEQ ID NO: 6 (LCDR3), según lo definido por el sistema de
25 numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de
complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden
las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (HCDR1),
SEQ ID NO: 8 (HCDR2) y SEQ ID NO: 9 (HCDR3); y tres regiones
determinantes de complementariedad de cadena ligera (las
30 LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ

ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) y SEQ ID NO: 12 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

D es un agente terapéutico, por ejemplo, una fracción de eribulina;

5 L es un enlazador escindible que conecta covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 8.

[0020] En algunas realizaciones, p es un número entero de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es 2 o 6.

10 [0021] En algunas realizaciones, el ADC comprende un enlazador escindible que comprende una fracción escindible que se coloca de manera que ninguna parte del enlazador o del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno permanezca unida al agente terapéutico (por ejemplo, eribulina) tras la
15 escisión. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende una fracción peptídica escindible que es escindible por una enzima tal como la catepsina B. En algunas realizaciones, la fracción escindible comprende una fracción peptídica escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácidos
20 tal como Val-Cit. En algunas realizaciones, la unidad de aminoácidos comprende valina-citrulina (Val-Cit).

[0022] En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende al menos una unidad espaciadora que comprende al menos una fracción de PEG. En algunas
25 realizaciones, la unidad espaciadora o el enlazador comprende (PEG)₂. En algunas realizaciones, una unidad espaciadora se conecta a la fracción de anticuerpo a través de una fracción de maleimida (Mal) ("unidad espaciadora Mal"). En algunas realizaciones, la unidad espaciadora Mal
30 se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un resto de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión

a antígeno (por ejemplo, un resto LCcys80 en el anticuerpo). En algunas realizaciones, la unidad espaciadora Mal se une a un resto de cisteína (por ejemplo, LCcys80) de una región variable de cadena ligera en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, p es 2, de modo que dos fracciones -L-D están conectadas al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, cada fracción -L-D está conectada a un resto de cisteína (por ejemplo, LCcys80) de una región variable de cadena ligera en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el resto de cisteína es una LCcys80, es decir, un resto de cisteína en la posición de aminoácido 80 de una región variable de cadena ligera en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende la unidad espaciadora Mal y una fracción peptídica escindible y la fracción peptídica escindible comprende Val-Cit. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora Mal conecta el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno a la fracción escindible.

[0023] En algunas realizaciones, la unidad espaciadora Mal comprende al menos una fracción de PEG. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Mal-(PEG)₂. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora Mal conecta la fracción de anticuerpo a la fracción escindible en el enlazador. En algunas realizaciones, la fracción escindible en el enlazador es una fracción peptídica escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit.

[0024] En algunas realizaciones, la fracción escindible del ADC se une directamente a la eribulina, o una

unidad espaciadora conecta la fracción escindible en el enlazador a la fracción de fármaco de eribulina y la escisión del conjugado libera a la eribulina del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el enlazador.

5 **[0025]** En algunas realizaciones, la unidad espaciadora que conecta la fracción escindible a la fracción de fármaco de eribulina es autoinmolable. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora autoinmolable comprende p-aminobenciloxicarbonilo (pAB). En algunas realizaciones,
10 la unidad espaciadora de pAB conecta la fracción escindible a la fracción de fármaco de eribulina a través de una amina C-35. En algunas realizaciones, la fracción escindible es una fracción peptídica escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador
15 escindible comprende Val-Cit-pAB. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Val-Cit-pAB y una unidad espaciadora de PEG que une el enlazador a la fracción de anticuerpo a través de una fracción de Mal. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB.

20 **[0026]** En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC comprende armazones de región variable de cadena pesada y ligera humanas, o armazones de región variable de cadena pesada y ligera humana con una o más retromutaciones. En diversas realizaciones, el
25 anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un ADC comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 13, y una región variable de cadena ligera que
30 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un ADC comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región constante de cadena ligera kappa de Ig humana que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un ADC comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17, y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18.

[0027] En diversas realizaciones, el ADC tiene la Fórmula (I):

$$\text{Ab}-(\text{L-D})_p \quad (\text{I})$$

en donde

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse a la mesotelina y comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y SEQ ID NO: 3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) y SEQ ID NO: 6 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) y SEQ ID NO: 9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ

ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) y SEQ ID NO: 12 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

D es una eribulina;

L es un enlazador escindible que comprende Mal-(PEG)₂-
5 Val-Cit-pAB; y

p es un número entero de 1 a 8, por ejemplo, p es un número entero de 2 a 6 o de 3 a 4.

[0028] En algunas realizaciones, p es un número entero de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es 2 o 6.

10 **[0029]** En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC (por ejemplo, el ADC descrito anteriormente) comprende armazones de región variable de cadena pesada y ligera humana, o armazones de región variable de cadena pesada y ligera humanas con una o
15 más retromutaciones. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o que sea al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13, y una región
20 variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o que sea al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 14. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana que
25 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región constante de cadena ligera kappa de Ig humana que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC comprende la secuencia de
30 aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17, y la

secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18.

[0030] En diversas realizaciones, el ADC tiene la Fórmula I:

5 $Ab-(L-D)_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse a la mesotelina y comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

D es eribulina;

L es un enlazador escindible que comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; y

p es un número entero de 1 a 8, por ejemplo, p es un número entero de 2 a 6 o de 3 a 4.

[0031] En algunas realizaciones, p es un número entero de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es 2 o 6.

20 **[0032]** En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana y una región constante de cadena ligera kappa de Ig humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno
25 comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región constante de cadena ligera kappa de Ig que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión
30 a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, y una cadena

ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

[0033] En diversas realizaciones, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados y/o composiciones de ADC descritos. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno y/o uno o más ADC descritos en el presente documento junto con al menos un transportador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende múltiples copias del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende múltiples copias de un ADC divulgado en el presente documento, en donde el p promedio del ADC es de aproximadamente 1 a aproximadamente 6. En algunas realizaciones, el p promedio del ADC en la composición es de aproximadamente 1.7 o 2, o de aproximadamente 6.

[0034] En diversas realizaciones, en el presente documento se proporcionan usos terapéuticos para los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados y/o composiciones de ADC descritos, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de un cáncer que expresa un antígeno que es diana del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o la fracción de anticuerpo del conjugado o ADC, tal como la mesotelina. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos de destrucción o de inhibición de la proliferación de células tumorales o células cancerosas mediante la administración de una cantidad y/o régimen terapéuticamente

eficaz de uno cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados y/o de los ADC descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa mesotelina, tal como un mesotelioma, un cáncer de mama, un cáncer de cuello uterino, un cáncer colorrectal, un cáncer de endometrio, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón (por ejemplo, un cáncer de pulmón no microcítico), un cáncer de ovario (por ejemplo, un cáncer de ovario seroso o de células claras), un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un cáncer renal, un cáncer gástrico, un cáncer tiroideo, un cáncer urotelial, un cáncer de útero, un cáncer de las vías biliares o una leucemia.

[0035] En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona usos para los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados y/o compuestos de ADC y composiciones descritos, por ejemplo, para determinar si un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer (por ejemplo, un cáncer que expresa mesotelina) será sensible al tratamiento con un agente dirigido a la mesotelina, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo, conjugado o ADC divulgado en el presente documento. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra biológica del sujeto; poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento; y detectar la unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a una o más células cancerosas en la muestra.

[0036] En otros aspectos determinados, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo,

conjugado y/o ADC y un diluyente, transportador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, se proporcionan métodos de producción del anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo, conjugado o compuestos de ADC y composiciones divulgados.

[0037] En algunas realizaciones, se proporciona una secuencia (o secuencias) de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, un conjugado o un ADC de la presente divulgación. El ácido nucleico (o ácidos nucleicos) puede estar en forma de un ácido nucleico aislado, un ácido nucleico incorporado en un vector aislado que lo comprende, y/o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno expresarse por parte de una población celular en condiciones adecuadas para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0038] La FIG. 1 muestra la detección de la reactividad específica de sueros inmunes contra la mesotelina humana mediante citometría de flujo.

[0039] La FIG. 2 muestra la detección de la reactividad específica de los sobrenadantes de cultivo a la mesotelina humana mediante ELISA.

[0040] La FIG. 3 muestra la amplificación por PCR In-Fusion de anticuerpos anti-mesotelina mediante gel de electroforesis.

[0041] La FIG. 4 muestra clones anti-mesotelina para clonación y expresión por In-Fusion.

[0042] La FIG. 5 muestra un resumen de 48 anticuerpos anti-mesotelina Rb-hu-xi purificados.

[0043] La FIG. 6 muestra resultados de potencias basados en células *in vitro* para conjugados anti-mesotelina-AuF.

[0044] La FIG. 7 muestra la caracterización por agrupamiento (*binning*) de epítomos de anticuerpos anti-mesotelina.

[0045] La FIG. 8 muestra los resultados del análisis por DSC (forma siglada de *differential scanning calorimetry*, calorimetría de barrido diferencial) para los anticuerpos 345A12 humanizados. Los fragmentos F(ab')₂ de 345A12 se sometieron a un análisis térmico que variaba de 25-100 °C utilizando una tasa de exploración de 100 °C/hora.

[0046] La FIG. 9 muestra la estabilidad de MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina) (DAR2) en diversas matrices.

[0047] La FIG. 10A y la FIG. 10B muestran el efecto antitumoral (FIG. 10A) y el cambio de peso corporal (FIG. 10B) en un modelo de xenoinjerto NCI-H2110 de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) humano tratado con ADC 345A12-HC1-LC2-dímero de eribulina diOH a 2.5 mg/kg o ADC 102A6A2-HC1-LC2-dímero de eribulina diOH a 2.5 mg/kg (Estudio M109-004-2016).

[0048] La FIG. 11A y la FIG. 11B muestran el cambio de peso corporal de ratones CD-1 hembra tratados con ADC 345A12-HC1-LC2-dímero de eribulina diOH (5, 10, 15 o 20 mg/kg) (FIG. 11A) o ADC 345A12-HC15-LC4-dímero de eribulina diOH (5, 10 o 20 mg/kg) (FIG. 11B) (Estudio M109-006-2017).

[0049] La FIG. 12A y la FIG. 12B muestran el efecto antitumoral (FIG. 12A) y el cambio de peso corporal (FIG. 12B) en un modelo de xenoinjerto de CPNM humano NCI-H2110 tratado con ADC 345A12-HC10-LC4-dímero de eribulina diOH a

2.5 mg/kg o ADC 345A12-HC15-LC4-dímero de eribulina diOH a 2.5 mg/kg (Estudio M109-007-2017).

[0050] La FIG. 13A y la FIG. 13B muestran el efecto antitumoral (FIG. 13A) y el cambio de peso corporal (FIG. 13B) en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano NCI-N87 tratado con MORAb-109 (DAR2 o DAR6) (Estudio M109-010-2018).

[0051] La FIG. 14A y la FIG. 14B muestran el efecto antitumoral (FIG. 14A) y el cambio de peso corporal (FIG. 14B) en un modelo de xenoinjerto de mesotelioma humano HAY tratado con MORAb-109 (DAR2 o DAR6) o eribulina (Estudio M109-010-2018).

[0052] La FIG. 15A y la FIG. 15B muestran el efecto antitumoral (FIG. 15A) y el cambio de peso corporal (FIG. 15B) en un modelo de PDX (forma siglada de *patient derived xenograft*, xenoinjerto obtenido de paciente) de mesotelioma humano (Meso7212) tratado con MORAb-109 (DAR6) o eribulina.

[0053] La FIG. 16A y la FIG. 16B muestran el efecto antitumoral (FIG. 16A) y el cambio de peso corporal (FIG. 16B) en un modelo de PDX de mesotelioma humano (Meso7212) tratado con distintas especies de DAR de MORAb-109 o eribulina.

[0054] La FIG. 17 muestra un análisis de correlación entre la expresión de mesotelina (MSLN) y la potencia *in vitro* (CI₅₀) de eribulina y MORAb-109 (DAR2 y DAR6) en diversas líneas celulares. La correlación para MORAb-109 (DAR2) se analizó en las 51 líneas celulares y en un subconjunto de líneas celulares con niveles más altos de expresión de mesotelina (tinción de FACS de intensidad de fluorescencia media (IFM) igual o > 80). El subconjunto

excluyó las líneas celulares con niveles de expresión de mesotelina más bajos (tinción de FACS de IFM <80).

[0055] La FIG. 18A-C muestran el efecto antitumoral (FIG. 18A y la FIG. 18B) y el cambio de peso corporal (FIG. 18C) en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano NCI-N87 tratado con distintas dosis de MORAb-109 (DAR2) que varían de 5 mg/kg a 25 mg/kg.

[0056] La FIG. 19 muestra las concentraciones (µg/ml) de MORAb-109 (DAR2) total e intacto en ratones portadores de tumores NCI-N87 después del tratamiento con distintas dosis de MORAb-109 (DAR2) que varían de 5 mg/kg a 25 mg/kg.

[0057] La FIG. 20A y la FIG. 20B muestran el efecto antitumoral (FIG. 20A) y el cambio de peso corporal (FIG. 20B) en un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano OVCAR-3-A1-T1 tratado con MORAb-109 (DAR2) (5 mg/kg) o eribulina (0.1 o 3.2 mg/kg).

[0058] La FIG. 21A y la FIG. 21B muestran el efecto antitumoral (FIG. 21A) y el cambio de peso corporal (FIG. 21B) en un modelo de PDX de CPNM humano (LC-F-25) tratado con MORAb-109 (DAR2) (10 mg/kg) o eribulina (0.1 o 3.2 mg/kg).

[0059] La FIG. 22A y la FIG. 22B muestran el efecto antitumoral (FIG. 22A) y el cambio de peso corporal (FIG. 22B) en un modelo de PDX de CPNM humano (LXFA-737) tratado con MORAb-109 (DAR2) (10 mg/kg) o eribulina (0.2 o 3.2 mg/kg).

[0060] La FIG. 23A y la FIG. 23B muestran el efecto antitumoral (FIG. 23A) y el cambio de peso corporal (FIG. 23B) en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano NCI-N87 tratado con una dosis única de MORAb-109 (DAR2 o DAR6) a 10 mg/kg (3 ratones por grupo).

[0061] La FIG. 24A y la FIG. 24B muestran el DAR de MORAb-109 (DAR2) (FIG. 24A) o MORAb-109 (DAR6) (FIG. 24B) en muestras de plasma de ratones portadores de tumores NCI-N87 después del tratamiento con una dosis única de MORAb-109
5 (DAR2 o DAR6) a 10 mg/kg.

[0062] La FIG. 25A y la FIG. 25B muestran la citotoxicidad (% de destrucción) de MORAb-109 (DAR2) (FIG. 25A) o BAY 94-9343 (FIG. 25B) en células de cáncer gástrico NCI-N87. Ambos ADC anti-MSLN se evaluaron solos y en
10 presencia de anticuerpos no conjugados.

[0063] La FIG. 26A y la FIG. 26B muestran la actividad de ADCC de MORAb-109 (DAR2) y 345A12-HC15-LC4 (FIG. 26A) o BAY 94-9343 y anetumab (FIG. 26B), medida mediante un ensayo de luciferasa. La actividad de ADCC se calculó mediante el
15 área bajo la curva (ABC) relativa.

[0064] La FIG. 27 muestra un análisis de estabilidad de los ADC anti-MSLN, MORAb-109 (DAR2) y BAY 94-9343, en plasma humano y de ratón.

[0065] La FIG. 28A y la FIG. 28B muestran el efecto antitumoral (FIG. 28A) y el cambio de peso corporal (FIG. 28B) en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano NCI-N87 tratado con MORAb-109 (DAR2) (5 mg/kg), BAY 94-9343 (5 mg/kg) o eribulina (1 mg/kg).
20

[0066] La FIG. 29A y la FIG. 29B muestran el efecto antitumoral (FIG. 29A) y el cambio de peso corporal (FIG. 29B) en un modelo de xenoinjerto de mesotelioma humano HAY tratado con MORAb-109 (DAR2) (5 mg/kg), BAY 94-9343 (5 mg/kg) o eribulina (1 mg/kg).
25

[0067] La FIG. 30A y la FIG. 30B muestran el efecto antitumoral (FIG. 30A) y el cambio de peso corporal (FIG. 30B) en un modelo de PDX de mesotelioma humano (Meso7212)
30

tratado con MORAb-109 (DAR2) (10 mg/kg), BAY 94-9343 (10 mg/kg), eribulina (1 mg/kg) o DM4 (0.3 mg/kg).

[0068] La FIG. 31A y la FIG. 31B muestran el efecto antitumoral (FIG. 31A) y el cambio de peso corporal (FIG. 31B) en un modelo de PDX de CPNM humano (LXFA-586) tratado con MORAb-109 (DAR2) (25 mg/kg), BAY 94-9343 (DAR ~ 4) (25 mg/kg) o eribulina (3.2 mg/kg).

[0069] La FIG. 32A y la FIG. 32B muestran el efecto antitumoral (FIG. 32A) y el cambio de peso corporal (FIG. 32B) en un modelo de PDX de CPNM humano (LXFL-529) tratado con MORAb-109 (DAR2) (25 mg/kg), MORAb-109 (DAR2) (12.5 mg/kg), MORAb-109 (DAR2) (12.5 mg/kg, c/semana x3), BAY 94-9343 (DAR ~ 4) (12.5 mg/kg) o eribulina (3.2 mg/kg).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0070] Las composiciones y métodos divulgados pueden entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada tomada en conexión con las figuras adjuntas, que forman parte de la presente divulgación. Debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares solo a modo de ejemplo y no pretende limitar las composiciones y métodos reivindicados a menos que el contexto indique otra cosa.

[0071] A lo largo del presente texto, las descripciones se refieren a composiciones y métodos de uso de las composiciones. En los casos en los que la divulgación describe o reivindica una característica o realización asociada a una composición, tal característica o realización se aplica igualmente a los métodos de uso de la composición. Asimismo, en los casos en los que la divulgación describe o reivindica una característica o realización asociada a un

método de uso de una composición, tal característica o realización se aplica igualmente a la composición.

[0072] Cuando se expresa un intervalo de valores, este incluye realizaciones que usan cualquier valor particular dentro del intervalo. Además, la referencia a los valores indicados en intervalos incluye todos y cada uno de los valores dentro del intervalo. Todos los intervalos incluyen sus extremos y pueden combinarse. Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entiende que el valor particular forma otra realización. La referencia a un valor numérico particular incluye al menos el valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El uso de "o" significará "y/o" a menos que el contexto específico de su uso dicte lo contrario. Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia a todos los efectos. En caso de que exista conflicto entre una referencia y la memoria descriptiva, prevalecerá la memoria descriptiva.

[0073] Debe apreciarse que determinadas características de las composiciones y métodos divulgados, que por claridad se describen en el presente documento en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de las composiciones y métodos divulgados, que por brevedad se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier combinación secundaria.

30 Definiciones

[0074] A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se usan diversos términos relativos a los aspectos de la descripción. A tales términos se les debe dar su significado ordinario en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos de manera específica deben interpretarse de una manera coherente con las definiciones proporcionadas en el presente documento.

[0075] Como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen las formas en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0076] El término "aproximadamente" o "alrededor", en el contexto de los valores e intervalos numéricos se refiere a valores o intervalos que se aproximan o que son próximos a los valores o intervalos citados, de tal forma que la realización puede realizarse del modo previsto, tal como teniendo una cantidad deseada de ácidos nucleicos o polipéptidos en una mezcla de reacción, como resulta evidente para un experto en la materia a partir de las enseñanzas contenidas en el presente documento. Por lo tanto, estos términos abarcan valores más allá de los resultantes del error sistemático. En algunas realizaciones, aproximadamente significa más o menos un 10 % de una cantidad numérica.

[0077] Las expresiones "conjugado de fármaco-anticuerpo", "conjugado de anticuerpo", "conjugado", "inmunoconjugado" y "ADC" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto terapéutico (por ejemplo, una fracción de eribulina) que está unido a una fracción de anticuerpo y se define por la fórmula genérica: $Ab-(LD)_p$ (Fórmula I), en donde Ab es una fracción de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno), L

es una fracción de enlazador, D es una fracción de fármaco (por ejemplo, una fracción de fármaco de eribulina) y p es el número de fracciones de fármaco por fracción de anticuerpo. En los ADC que comprenden una fracción de fármaco de eribulina, "p" se refiere al número de fracciones de eribulina unidas a la fracción de anticuerpo. En algunas realizaciones, el enlazador L puede incluir una fracción escindible que puede conectarse directamente a la fracción de anticuerpo y al compuesto terapéutico, o la fracción escindible puede conectarse a la fracción de anticuerpo o al compuesto terapéutico, o a ambas, mediante la unidad (o unidades) espaciadora. En algunas realizaciones, cuando una unidad espaciadora conecta la fracción escindible al compuesto terapéutico, es una unidad espaciadora autoinmolable.

[0078] El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio para referirse a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. La cadena pesada de un anticuerpo está compuesta por un dominio variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La cadena ligera está compuesta por un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio constante de cadena ligera (CL). Para los fines de la presente solicitud, los dominios variables maduros de cadena pesada y cadena ligera comprenden cada uno tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) dentro de cuatro regiones marco conservadas (FR1, FR2, FR3

y FR4) dispuestas desde el extremo N al extremo C: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Un "anticuerpo" puede ser de origen natural o artificial, tal como los anticuerpos monoclonales producidos mediante tecnología de hibridomas
5 convencional. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales de longitud completa y anticuerpos policlonales de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos monocatenarios. Un anticuerpo puede ser de una cualquiera de las cinco clases
10 principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases de los mismos (por ejemplo, los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). El término abarca además anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y cualquier molécula de inmunoglobulina modificada que
15 contenga un sitio de reconocimiento de antígeno, siempre que demuestre la actividad biológica deseada.

[0079] La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente
20 homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades mínimas. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo epítipo antigénico.
25 Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) incluyen normalmente una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítopos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de
30 una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que precisa la producción del

anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar en conformidad con la presente divulgación pueden fabricarse mediante el método de hibridomas descrito por primera vez por Kohler *et al.* (1975) Nature 256:495, o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4,816,567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de fagotecas de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) Nature 352:624-8 y Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97, por ejemplo.

[0080] Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos", en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la cadena (o cadenas) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que se unan específicamente al antígeno diana y/o presenten la actividad biológica deseada.

[0081] La expresión "anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se obtiene de dos o más especies. En algunos casos, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera corresponden a las regiones variables de anticuerpos obtenidos de una especie con la especificidad, afinidad y actividad deseadas, mientras que las regiones constantes son

homólogas a anticuerpos obtenidos de otra especie (por ejemplo, del ser humano) para minimizar una respuesta inmunitaria en la última especie.

[0082] Como se usa en el presente documento, la
5 expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de conejo) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas obtenidas de una
10 inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todo
15 o sustancialmente todas las regiones marco (FR, *framework*) conservadas son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina
20 humana. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de restos, ya sea en la región marco conservada Fv y/o dentro de los restos no humanos sustituidos para perfeccionar y optimizar la especificidad, la afinidad y/o la actividad del anticuerpo.

25 [0083] La expresión "fragmento de unión a antígeno", "dominio de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo o proteína que conservan la capacidad de unirse específicamente a un
30 antígeno (por ejemplo, la mesotelina). Los fragmentos de unión a antígeno también pueden conservar la capacidad de

internalizarse en una célula que expresa el antígeno. En algunas realizaciones, los fragmentos de unión a antígeno también conservan la actividad efectora inmunitaria. Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de unión a antígeno de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "fragmento de unión a antígeno", "dominio de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb, que comprende un solo dominio variable, por ejemplo, un dominio VH (véanse, por ejemplo, Ward *et al.* (1989) *Nature* 341:544-6; y la Pub. Int. N.º WO 1990/005144); y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, pueden unirse utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una única cadena proteica en la que las regiones VL y regiones VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarias (scFv)). Véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-6 y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83. Además, se pretende que tales anticuerpos monocatenarios estén abarcados en la expresión "fragmento de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo

y se conocen en la técnica como un tipo ilustrativo de fragmento de unión que puede internalizarse en las células tras su unión (véanse, por ejemplo, Zhu *et al.* (2010) 9:2131-41; He *et al.* (2010) J. Nucl. Med. 51:427-32 y Fitting *et al.* (2015) MAbs 7:390-402). En determinadas realizaciones, las moléculas de scFv pueden incorporarse en una proteína de fusión. También se abarcan otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo el emparejamiento de los dominios con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-8 y Poljak *et al.* (1994) Structure 2:1121-3). Los fragmentos de unión a antígeno se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos de unión se criban para determinar su utilidad (por ejemplo, afinidad de unión, internalización) del mismo modo que los anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión a antígeno pueden prepararse mediante escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante escisión con proteasas o química.

25 **[0084]** "Internalización", como se usa en el presente documento en referencia a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que es capaz de introducirse a través de la membrana de bicapa lipídica de la célula a un compartimento interno (es decir, "se internaliza") al unirse a la célula, 30 normalmente en un compartimento de degradación de la célula.

Por ejemplo, un anticuerpo anti-mesotelina que se internaliza es uno que es capaz de introducirse en la célula después de unirse a la mesotelina en la membrana celular. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a
5 antígeno utilizado en los ADC divulgados en el presente documento se dirige a un antígeno de la superficie celular (por ejemplo, la mesotelina) a través de un anticuerpo que se internaliza o un fragmento de unión a antígeno que se internaliza (permitiendo que el ADC se transfiera a través
10 de la membrana celular después de la unión al antígeno).

[0085] El término "mesotelina" o "MSLN", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier forma nativa de la mesotelina humana (MSLN). El término abarca la mesotelina de longitud completa (por ejemplo, la secuencia
15 de referencia del NCBI: AAC50348.1), así como cualquier forma de mesotelina humana que sea el resultado de un procesamiento celular. El término también abarca variantes de origen natural de la mesotelina, incluidas, pero sin limitación, variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas.
20 La mesotelina puede aislarse de un ser humano o puede producirse de forma recombinante o mediante métodos sintéticos. El término también puede abarcar cualquier variante sintética a la que se pueda unir específicamente un anticuerpo anti-mesotelina, por ejemplo, un anticuerpo
25 divulgado en el presente documento y/o un fragmento de unión a antígeno.

[0086] La expresión "anticuerpo anti-mesotelina" o "anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina" se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo
30 que se une específicamente a la mesotelina y abarca anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales

de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo biológicamente funcionales siempre que se unan específicamente a la mesotelina. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina utilizado en los ADC

5 divulgados en el presente documento es un anticuerpo que se internaliza o un fragmento de anticuerpo que se internaliza. 345A12 (por ejemplo, 345A12-HC15-LC4) y 102A6A2 son anticuerpos anti-mesotelina humana que se internalizan ilustrativos. Como se usa en el presente documento, las

10 expresiones "específico", "se une específicamente" y "específicamente se une" se refieren a la unión selectiva del anticuerpo al epítipo del antígeno diana. Los anticuerpos pueden probarse en cuanto a la especificidad de unión comparando la unión a un antígeno apropiado con la unión a

15 un antígeno irrelevante o una mezcla de antígenos en un conjunto dado de condiciones. Si el anticuerpo se une al antígeno apropiado con al menos 2, 5, 7 o 10 veces más afinidad que al antígeno irrelevante o a la mezcla de antígenos, se considera que es específico. Un "anticuerpo

20 específico" o "anticuerpo específico de diana" es uno que solo se une al antígeno diana (por ejemplo, la mesotelina), pero no se une (o presenta una unión mínima) a otros antígenos.

[0087] El término "epítipo" se refiere a la porción

25 de un antígeno que reconoce y al que se puede unir específicamente un anticuerpo. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario del polipéptido. El

30 epítipo unido por un anticuerpo puede identificarse usando cualquier técnica de mapeo de epítopos conocida en la

técnica, incluyendo cristalografía de rayos X para la identificación de epítomos mediante visualización directa del complejo de antígeno-anticuerpo, así como controlando la unión del anticuerpo a fragmentos o variaciones mutadas del antígeno, o controlando la accesibilidad al disolvente de diferentes partes del anticuerpo y del antígeno. Las estrategias ilustrativas utilizadas para mapear epítomos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, exploración de oligopéptidos basado en matrices, proteólisis limitada, mutagénesis dirigida al sitio, mapeo de mutagénesis de alto rendimiento, intercambio de hidrógeno-deuterio y espectrometría de masas (véase, por ejemplo, Gershoni *et al.* (2007) 21:145-56 y Hager-Braun and Tomer (2005) Expert Rev. Proteomics 2:745-56).

15 **[0088]** La unión competitiva y el agrupamiento de epítomos también se pueden usar para determinar anticuerpos que comparten epítomos idénticos o superpuestos. La unión competitiva se puede evaluar usando un ensayo de bloqueo cruzado, tal como el ensayo descrito en "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow y Lane (1ª edición 1988, 2ª edición 2014). En algunas realizaciones, la unión competitiva se identifica cuando un anticuerpo o una proteína de unión de prueba reduce la unión de un anticuerpo de referencia o una proteína de unión a un antígeno diana tal como la mesotelina (por ejemplo, una proteína de unión que comprende las CDR y/o dominios variables seleccionados de los identificados en las Tablas 1-3), en al menos un 50 % en el ensayo de bloqueo cruzado (por ejemplo, el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99.5 % o más, o cualquier porcentaje intermedio), y/o viceversa. En algunas realizaciones, la unión competitiva

puede deberse a epítopos compartidos o similares (por ejemplo, parcialmente superpuestos), o deberse a un impedimento estérico donde los anticuerpos o proteínas de unión se unen a epítopos cercanos (véase, por ejemplo, 5 Tzartos, *Methods in Molecular Biology* (Morris, ed. (1998) vol. 66, pág. 55-66)). En algunas realizaciones, la unión competitiva puede usarse para clasificar grupos de proteínas de unión que comparten epítopos similares. Por ejemplo, las proteínas de unión que compiten por la unión se pueden 10 "agrupar" como un grupo de proteínas de unión que tienen epítopos superpuestos o cercanos, mientras que las que no compiten se colocan en un grupo separado de proteínas de unión que no tienen epítopos superpuestos o cercanos.

[0089] El término " k_{on} " o " k_a " se refiere a la 15 constante de asociación para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno. La constante se puede determinar utilizando ensayos convencionales, tales como resonancia de plasmón superficial, interferometría de biocapa o ensayo ELISA.

20 [0090] El término " k_{off} " o " k_d " se refiere a la constante disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno. La constante se puede determinar utilizando ensayos convencionales, tales como resonancia de plasmón superficial, interferometría de 25 biocapa o ensayo ELISA.

[0091] El término " K_D " se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción antígeno-anticuerpo particular. La K_D se calcula mediante k_a/k_d . La constante se puede determinar utilizando ensayos 30 convencionales, tales como resonancia de plasmón superficial, interferometría de biocapa o ensayo ELISA.

[0092] El término "p" o "carga de fármaco" o "relación fármaco:anticuerpo" o "relación fármaco con respecto al anticuerpo" o "DAR" (forma siglada de *drug-to-antibody ratio*), se refiere al número de fracciones de fármaco por fracción de anticuerpo, es decir, la carga de fármaco, o la cantidad de fracciones -L-D por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (Ab) en los ADC de fórmula (I). En los ADC que comprenden una fracción de fármaco de eribulina, "p" se refiere al número de fracciones de eribulina unidas a la fracción de anticuerpo. Por ejemplo, si dos fracciones de eribulina están unidas a una fracción de anticuerpo, $p = 2$. En composiciones que comprenden múltiples copias de los ADC de Fórmula (I), "p promedio" se refiere al número promedio de fracciones -L-D por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en una población de ADC, también denominado "carga promedio de fármaco".

[0093] Un "enlazador" o "fracción de enlazador" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquier fracción química que sea capaz de unir covalentemente un compuesto, habitualmente una fracción de fármaco tal como la eribulina, a otra fracción tal como una fracción de anticuerpo. Los enlazadores pueden ser susceptibles o sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, la escisión inducida por peptidasa, la escisión fotoinducida, la escisión inducida por esterasa y/o la escisión de enlace disulfuro, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanece activo.

[0094] El término "agente" se usa en el presente documento para referirse a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto elaborado a partir de materiales biológicos. La

expresión "agente terapéutico" o "fármaco" se refiere a un agente que es capaz de modular un proceso biológico y/o tiene actividad biológica. El monómero de eribulina descrito en el presente documento es un agente terapéutico ilustrativo.

5 **[0095]** La expresión "agente quimioterapéutico" o "agente antineoplásico" se usa en el presente documento para referirse a todos los agentes que son eficaces en el tratamiento del cáncer independientemente del mecanismo de acción. Con frecuencia, una de las propiedades de un agente quimioterapéutico es la inhibición de la metástasis o la angiogénesis. Los agentes quimioterapéuticos incluyen anticuerpos, moléculas biológicas y moléculas pequeñas, y abarcan la eribulina, como se describe en el presente documento. Un agente quimioterapéutico puede ser un agente
10 citotóxico o citostático. La expresión "agente citostático" se refiere a un agente que inhibe o suprime el crecimiento celular y/o la multiplicación de células. La expresión "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que provoca la muerte celular, principalmente interfiriendo con la actividad de expresión y/o el funcionamiento de una célula.
15 20

[0096] El término "eribulina" o la expresión "monómero de eribulina", como se usa en el presente documento, se refiere a un análogo sintético de la halicondrina B, un compuesto macrocíclico que se aisló originalmente de la esponja marina *Halichondria okadae*. La eribulina es un inhibidor de la dinámica de los microtúbulos, que se cree que se une a la tubulina e induce la detención del ciclo celular en la fase G2/M al inhibir el ensamblaje del huso mitótico. El término "mesilato de eribulina" se
25 refiere a la sal de mesilato de eribulina, que se comercializa con la marca comercial Halaven™. Los ejemplos
30

de análogos de eribulina incluyen los mostrados y descritos en la Patente de EE.UU. N.º 6,214,865 y la Patente de EE.UU. N.º 6,653,341, que se incorporan en el presente documento por referencia para las estructuras de eribulina divulgadas y los métodos de síntesis de las estructuras.

[0097] La expresión "dímero de eribulina", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma dimérica de la eribulina en la que dos monómeros de eribulina se conectan a través de un enlace covalente o no covalente, ya sea directamente o mediante un enlazador químico (por ejemplo, una amina secundaria, una amina secundaria dihidroxilada). Los dímeros de eribulina pueden, en algunas realizaciones, consistir en dos monómeros de eribulina unidos covalentemente en la posición C-34 por una amina secundaria, o dos monómeros de eribulina unidos covalentemente en la posición C-35 por una amina secundaria dihidroxilada. Un dímero de eribulina que consiste en dos monómeros de eribulina unidos covalentemente en la posición C-34 por una amina secundaria puede denominarse en el presente documento "dímero de eribulina desOH". Un dímero de eribulina que consiste en dos monómeros de eribulina unidos covalentemente en la posición C-35 por una amina secundaria dihidroxilada puede denominarse en el presente documento "dímero de eribulina diOH". La expresión "fracción de fármaco de dímero de eribulina" se refiere al componente de un ADC o composición que proporciona la estructura de un dímero de eribulina, por ejemplo, el componente de dímero de eribulina (D) en un ADC de Fórmula (I), o en una composición que comprende -L-D. En algunas realizaciones, un dímero de eribulina desOH y/o un dímero de eribulina diOH proporciona

una conjugabilidad mejorada sobre otros formatos de dímero de eribulina.

[0098] El término "criptoficina", como se usa en el presente documento, se refiere a la criptoficina-1, un compuesto macrólido que se aisló originalmente de la cianobacteria *Nostoc*, o a cualquier análogo sintético de la misma que conserva la actividad anti-tubulina. Los ejemplos de análogos de criptoficina incluyen los mostrados y descritos en Pub. Int. N.º WO 2017/136769, que se incorpora en el presente documento por referencia para todas sus estructuras de criptoficina divulgadas y métodos de síntesis de las estructuras. La expresión "fracción de fármaco de criptoficina" se refiere al componente de un ADC o composición que tiene la estructura de una criptoficina.

[0099] El término "homóloga" se refiere a una molécula que presenta homología con otra molécula, por ejemplo, que tiene secuencias de restos químicos que son iguales o similares en las posiciones correspondientes.

[00100] El término "inhibir" o la expresión "inhibición de", como se usa en el presente documento, significa reducir, en una cantidad medible y puede incluir, pero no precisa, la prevención o inhibición completa.

[00101] La expresión "destrucción por vecindad" o "efecto de vecindad" se refiere a la destrucción de células negativas para la diana en presencia de células positivas para la diana, en donde no se observa la destrucción de células negativas para la diana en ausencia de células positivas para la diana. El contacto de célula a célula, o al menos la proximidad entre las células positivas para la diana y las células negativas para la diana, permite que la destrucción por vecindad. Este tipo de destrucción se

distingue de la "muerte inespecífica", que se refiere a la destrucción indiscriminada de células negativas para la diana. Puede observarse "destrucción inespecífica" en ausencia de células positivas para la diana.

5 **[00102]** El término "cáncer" se refiere al estado fisiológico en mamíferos en que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero sin limitación, un carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los
10 ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cánceres que expresan mesotelina, tal como un mesotelioma, un cáncer de mama, un cáncer de cuello uterino, un cáncer colorrectal, un cáncer de endometrio, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón (por ejemplo, un cáncer
15 de pulmón no microcítico), un cáncer de ovario (por ejemplo, un cáncer de ovario seroso, de células claras o epitelial), un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un cáncer renal, un cáncer gástrico, un cáncer tiroideo, un cáncer urotelial, un cáncer de útero, un cáncer de las vías biliares
20 o una leucemia.

[00103] Los términos "tumor" y "neoplasia" se refieren a cualquier masa de tejido que sea el resultado del crecimiento o proliferación celular excesiva, ya sea benigna o maligna, incluyendo lesiones precancerosas.

25 **[00104]** Las expresiones "célula tumoral" se refieren a células individuales o a la población total de células obtenidas de un tumor, incluidas tanto células no tumorigénicas como células madre cancerosas. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula tumoral" se
30 modificará con la expresión "no tumorigénica" cuando haga referencia únicamente a aquellas células tumorales que

carecen de la capacidad para renovarse y diferenciarse, para distinguir dichas células tumorales de las células madre de cáncer.

[00105] Los términos "sujeto" y "paciente" se usan
5 indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier animal, tal como cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares. En algunas realizaciones, el mamífero es un ratón. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser
10 humano.

[00106] Una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite la administración y posteriormente proporciona la actividad biológica prevista del principio activo (o principios
15 activos) y/o logra un efecto terapéutico y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administrará la formulación. La composición farmacéutica puede ser estéril.

[00107] Un "excipiente farmacéutico" comprende un
20 material, tal como un adyuvante, un transportador, agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, conservantes y similares.

[00108] "Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o probable por un organismo competente del gobierno
25 federal o estatal, o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida, para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

[00109] Una "cantidad eficaz" de, por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC como se
30 divulga en el presente documento es una cantidad suficiente para realizar un fin específicamente establecido, por

ejemplo, para producir un efecto terapéutico después de la administración, tal como una reducción de la tasa de crecimiento tumoral o el volumen tumoral, una reducción de un síntoma de un cáncer o algún otro indicio de la eficacia del tratamiento. Puede determinarse una cantidad eficaz de un modo rutinario en relación con el fin indicado. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno y/o un ADC eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto. En el caso del cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC puede reducir la cantidad de células cancerosas, reducir el tamaño tumoral, inhibir (por ejemplo, ralentizar o detener) la metástasis tumoral, inhibir (por ejemplo, ralentizar o detener) el crecimiento tumoral y/o aliviar uno o más síntomas. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, dado que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[00110] Como se usa en el presente documento, "tratar" o "terapéutico" y los términos gramaticalmente relacionados, se refieren a cualquier mejora de cualquier consecuencia de la enfermedad, tal como una supervivencia prolongada, menos morbilidad y/o una reducción de los efectos secundarios que son los subproductos de una modalidad terapéutica alternativa. Como se aprecia fácilmente en la técnica, la erradicación completa de la enfermedad se

incluye, pero no es necesaria para un acto de tratamiento. "Tratamiento" o "tratar", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC descritos a un sujeto, por ejemplo, un paciente. El tratamiento puede ser para curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, calmar, paliar, mejorar o afectar al trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición hacia el trastorno, por ejemplo, un cáncer. En algunas realizaciones, además de tratar a un sujeto con una afección, también puede proporcionarse una composición divulgada en el presente documento de manera profiláctica para prevenir o reducir la probabilidad de desarrollar dicha afección.

[00111] En algunas realizaciones, se usa un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC marcado. Los "marcadores" adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, fracciones fluorescentes, fracciones quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares.

[00112] Por "proteína", como se usa en el presente documento, se entiende al menos dos aminoácidos conectados covalentemente. El término abarca polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. En algunas realizaciones, los dos o más aminoácidos conectados covalentemente están conectados por un enlace peptídico. La proteína puede estar formada por aminoácidos y enlaces peptídicos de origen natural, por ejemplo, cuando la proteína se produce de forma recombinante utilizando sistemas de expresión y células hospedadoras. Como alternativa, la proteína puede incluir aminoácidos sintéticos (por ejemplo, homofenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina). Una "proteína recombinante" es una

proteína fabricada usando técnicas recombinantes usando cualquier técnica y método conocido en la técnica, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante. Los métodos y técnicas para la producción de proteínas
5 recombinantes son bien conocidos en la técnica.

[00113] Para las secuencias de aminoácidos, la identidad y/o la similitud de secuencia pueden determinarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, que incluyen, entre otros, el algoritmo de identidad de la
10 secuencia local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:2444, implementaciones informatizadas
15 de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de programas informáticos de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux et al. (1984) Nucl. Acid Res. 12:387-95, por ejemplo, utilizando la
20 configuración predeterminada o mediante inspección. En algunas realizaciones, FastDB calcula el porcentaje de identidad basándose en los siguientes parámetros: penalización por falta de coincidencia de 1; penalización por hueco de 1; penalización por tamaño de hueco 0.33 y
25 penalización por unión de 30 ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pág. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc).

[00114] En general, la homología, similitud o
30 identidad de aminoácidos entre las proteínas divulgadas en el presente documento y variantes de las mismas, incluidas

las variantes de antígenos diana (tales como la mesotelina), las variantes de las secuencias de la tubulina y las variantes de los dominios variables de los anticuerpos (incluidas las CDR variantes individuales), son de al menos
5 el 80 % con las secuencias representadas en el presente documento, por ejemplo, homologías o identidades de al menos el 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, casi el 100 %, o el 100 %.

[00115] De manera similar, el "porcentaje (%) de
10 identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a la secuencia de ácido nucleico de los anticuerpos y otras proteínas identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos nucleotídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos nucleotídicos en la
15 secuencia codificante de la proteína de unión a antígeno. Un método específico utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 configurado en los parámetros predeterminados, con un intervalo de superposición y una fracción de superposición configurados en 1 y 0.125, respectivamente.

20 [00116] Si bien el sitio o la región para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la mutación en sí esté predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede realizarse
25 mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de CDR de proteínas de unión a antígeno expresadas se criban para determinar la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para fabricar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene
30 una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis de cebador MI3 y mutagénesis por PCR.

Anticuerpos anti-mesotelina y fragmentos de unión a antígeno

[00117] La presente divulgación se refiere, en diversas realizaciones, a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos capaces de unirse y/o de destruir
5 células tumorales (por ejemplo, células tumorales que expresan mesotelina), así como su uso en conjugados y composiciones terapéuticas.

[00118] En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden usarse solos, administrarse como parte de
10 composiciones farmacéuticas o terapias de combinación y/o como la fracción de anticuerpo en un ADC. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-mesotelina y los fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento son útiles por sí solos (es decir, en forma no
15 conjugada) y como fracción de anticuerpo en un ADC. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-mesotelina y fragmentos de unión a antígeno están humanizados. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-mesotelina y fragmentos de unión a antígeno contienen una secuencia mínima obtenida
20 de una inmunoglobulina no humana y conservan la reactividad de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de conejo) al tiempo que son menos inmunogénicos en el ser humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-mesotelina y los fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente
25 documento proporcionan uno o más de estabilidad, formulabilidad, agregación, afinidad de unión, eficacia terapéutica, toxicidad inespecífica y/o perfil metabólico mejorados en comparación con uno o más anticuerpos anti-mesotelina conocidos por los expertos en la materia.

30 [00119] En diversas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente

documento se unen específicamente a la mesotelina, por ejemplo, como se expresa en una célula cancerosa. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede unirse a un antígeno diana con una constante de disociación (K_D) de
5 ≤ 1 mM, ≤ 100 nM o ≤ 10 nM, o cualquier cantidad intermedia, medida mediante, por ejemplo, análisis de BIAcore®. En determinadas realizaciones, la K_D es de 1 pM a 500 pM. En algunas realizaciones, la K_D está entre 500 pM y 1 μ M, 1 μ M y 100 nM o 100 mM y 10 nM.

10 **[00120]** En algunas realizaciones, la fracción de anticuerpo es un anticuerpo de cuatro cadenas (también denominado inmunoglobulina), que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. En algunas realizaciones, la fracción de anticuerpo es un medio cuerpo de dos cadenas
15 (una cadena ligera y una cadena pesada) o un fragmento de unión a antígeno de una inmunoglobulina.

[00121] En algunas realizaciones, la fracción de anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, la fracción de anticuerpo es un anticuerpo que se internaliza o un fragmento de unión a antígeno que se internaliza del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se internaliza o fragmento de unión a antígeno que se internaliza del mismo se une a un antígeno del cáncer diana que se expresa en la superficie de
20 una célula y entra en la célula tras su unión. En algunas realizaciones, la fracción de fármaco de eribulina del ADC se libera de la fracción de anticuerpo del ADC después de que el ADC entra y está presente en una célula que expresa el antígeno de cáncer diana (es decir, después de que el ADC
25 se ha internalizado).

30

[00122] En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento puede comprender un conjunto emparejado de dominios variables de cadena pesada y ligera tomados de los enumerados en las Tablas 3-5, o el conjunto de seis secuencias de CDR del conjunto emparejado de cadena pesada y ligera, por ejemplo, un conjunto de las CDR enumeradas en las Tablas 1-2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende además armazones de cadena pesada y ligera humanas (opcionalmente con una o más retromutaciones para mejorar la afinidad de unión) y/o dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender un dominio constante de cadena pesada de IgG humana (tal como una IgG1) y un dominio constante de cadena ligera kappa o lambda humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina G subtipo 1 (IgG1) con un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig humana.

[00123] Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de los anticuerpos ilustrativos de la presente divulgación se exponen en las Tablas 1-10.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de las CDR de Kabat para un anticuerpo anti-mesotelina

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
345A12-HC15-LC4	HC CDR1	1	SYAMS
	HC CDR2	2	VIDISGNRFYADWVKG
	HC CDR3	3	VDSRAWGPFNL
	LC CDR1	4	QASQSIFSYLE

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
	LC CDR2	5	DASDLAS
	LC CDR3	6	QQGYTRSDVDNA

5 **Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de las CDR de IMGT para un anticuerpo anti-mesotelina**

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
345A12-HC15-LC4	HC CDR1	7	GIDLSSYA
	HC CDR2	8	IDISGNR
	HC CDR3	9	ARVDSRAWGPFNL
	LC CDR1	10	QSIFSY
	LC CDR2	11	DAS
	LC CDR3	12	QQGYTRSDVDNA

10
15 **Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de regiones variables para un anticuerpo anti-mesotelina**

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
345A12-HC15-LC4	Cadena pesada	13	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGIDLSSYA MSWVRQAPGKGLEWIGVIDISGNRFYADWVKGR FTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVD SRAWGPFNLWGQGLTVTVSS
	Cadena ligera	14	DYQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIFSYL AWYQQKPGKAPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQCEDAATYYCQQGYTRSDVDN AFGGGTKVEIK

20
25 **Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de regiones constantes para un anticuerpo anti-mesotelina**

mAb	Cadena de IgG	Región constante	SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
-----	---------------	------------------	--------	--------------------------

30

5	345A12 -HC15- LC4	Cade na pesa da	IgG1 human a	15	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10		Cade na lige ra	Kappa de Ig human a	16	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 **Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de cadenas Ig de anticuerpos de longitud completa para un anticuerpo anti-mesotelina**

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
20	345A12-HC15-LC4	Cadena pesada	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGIDLSSYAMSWVRQA PGKGLEWIGVIDISGNRFYADWVKGRFTISRDNKNTLYLQ MSSLR AEDTAVYYCARVDSRAWGPFNLWGQGTILVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQLDNLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
25		Cadena ligera	18	DYQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSF SYLAWYQQK P GKAPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQCEDAATYYCQQGYTRSDVDNAFGGGTKVEIKRTVAAP SVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSG
30				

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
			NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC

Tabla 6. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican las CDR de Kabat para un anticuerpo anti-mesotelina

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de ácido nucleico
345A12- HC15-LC4	HC CDR1	19	TCCTACGCCATGTCC
	HC CDR2	20	GTGATCGACATCTCCGGCAACCGTTCTACGCCGACT GGGTGAAGGGC
	HC CDR3	21	GTGGACTCTAGAGCCTGGGGCCCCCTTCAACCTG
	LC CDR1	22	CAGGCCTCCCAGTCCATCTTCTCCTACCTGGCC
	LC CDR2	23	GACGCCTCTGATCTGGCCTCC
	LC CDR3	24	CAGCAGGGCTACACCAGATCCGACGTGGACAACGCC

Tabla 7. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican las CDR de IMGT para un anticuerpo anti-mesotelina

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de ácido nucleico
345A12- HC15-LC4	HC CDR1	25	GGAATCGACCTGTCCTCCTACGCC
	HC CDR2	26	ATCGACATCTCCGGCAACCGG
	HC CDR3	27	GCCAGAGTGGACTCTAGAGCCTGGGGCCCCCTTCAACCT G
	LC CDR1	28	CAGTCCATCTTCTCCTAC
	LC CDR2	29	GACGCCTCT
	LC CDR3	30	CAGCAGGGCTACACCAGATCCGACGTGGACAACGCC

Tabla 8. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones variables para un anticuerpo anti-mesotelina

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de ácido nucleico
345A12-HC15-LC4	Cadena pesada	31	CAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGTGGCGGAGTGGTGCAG CCTGGCAGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGA ATCGACCTGTCTCTACGCCATGTCTGGGTGCGACAG GCTCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCGTGATCGAC ATCTCCGGCAACCGGTTCTACGCCGACTGGGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACCCTG TACCTCCAGATGTCTCCCTGCGGGCCGAGGATACCGCC GTGTACTACTGCGCCAGAGTGGACTCTAGAGCCTGGGGC CCCTTCAACCTGTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACCGTG TCCTCT
	Cadena ligera	32	GATTACCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCT TCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTGAGGCCTCC CAGTCCATCTTCTCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCTCT GATCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCT GGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTC CAGTGCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGC TACACCAGATCCGACGTGGACAACGCCTTTGGCGGAGGC ACCAAGGTGGAAATCAAA

Tabla 9. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones constantes para un anticuerpo anti-mesotelina

mAb	Cadena de IgG	Región constante	SEQ ID	Secuencia de ácido nucleico
345A12-HC15-LC4	Cadena pesada	IgG1 humana	33	GCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTC AGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC

5				CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGAGAAACAACACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC TTATATTCAAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAATG A
25	Cade na lige ra	Kappa de Ig human a	34	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG TTGA
30				

Tabla 10. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican cadenas de Ig de anticuerpos de longitud completa para un anticuerpo anti-mesotelina⁺

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de ácido nucleico
345A12-HC15-LC4	Cadena pesada	35	CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGTGGCGGAGTGGTGCAG CCTGGCAGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGA ATCGACCTGTCTCTACGCCATGTCTGGGTGCGACAG GCTCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCGTGATCGAC ATCTCCGGCAACCGGTTCTACGCCGACTGGGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACCCTG TACCTCCAGATGTCTCCCTGCGGGCCGAGGATAACGCC GTGTACTACTGCGCCAGAGTGGACTCTAGAGCCTGGGGC CCCTTCAACCTGTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACCGTG TCCTCTGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA AAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID	Secuencia de ácido nucleico
5			GGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA
	Cadena ligera	36	GATTACCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCT TCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCCTCC CAGTCCATCTTCTCCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCTCT 10 GATCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCT GGCTCTGGCACC GACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTC CAGTGCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGC TACACCAGATCCGACGTGGACAACGCCTTTGGCGGAGGC ACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT 15 GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC 20 GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTC ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA

+ Las secuencias de ácidos nucleicos enumeradas no incluyen secuencias líder.

[00124] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento que se une a mesotelina humana comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y SEQ ID NO: 3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) y SEQ ID NO: 6 (LCDR3), según lo definido

por el sistema de numeración de Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[00125] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento que se une a mesotelina humana comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) y SEQ ID NO: 9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) y SEQ ID NO: 12 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT.

[00126] En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera, en donde las CDR incluyen no más de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos de HCDR1 (SEQ ID NO: 1 de acuerdo con Kabat, o la SEQ ID NO: 7 de acuerdo con IMGT), HCDR2 (SEQ ID NO: 2 de acuerdo con Kabat, o la SEQ ID NO: 8 de acuerdo con IMGT), HCDR3 (SEQ ID NO: 3 de acuerdo con Kabat, o la SEQ ID NO: 9 de acuerdo con IMGT); y LCDR1 (SEQ ID NO: 4 de acuerdo con Kabat, o la SEQ ID NO: 10 de acuerdo con IMGT), LCDR2 (SEQ ID NO: 5 de acuerdo con Kabat, o la SEQ ID NO: 11 de acuerdo con IMGT), y LCDR3 (SEQ ID NO: 6 de acuerdo con Kabat, o la SEQ ID NO: 12 de acuerdo con IMGT).

[00127] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno contiene una secuencia mínima

obtenida de una inmunoglobulina no humana y conserva la reactividad de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de conejo) al tiempo que es menos inmunogénico en el ser humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o
5 fragmento de unión a antígeno proporciona uno o más estabilidad, formulabilidad, afinidad de unión, eficacia terapéutica y/o niveles de agregación disminuidos mejorados en comparación con uno o más anticuerpos anti-mesotelina alternativos.

10 **[00128]** En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o una secuencia que sea al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13, y/o
15 una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o una secuencia que sea al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 14. En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante
20 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o una secuencia que sea al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 15, y/o una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o una secuencia que sea al menos el 90 %
25 idéntica a la SEQ ID NO: 16.

[00129] En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17 o una secuencia que sea al menos el 90 % idéntica a
30 la SEQ ID NO: 17, y/o una secuencia de aminoácidos de cadena

ligera de la SEQ ID NO: 18 o una secuencia que sea al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 18.

[00130] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera kappa de Ig humana.

[00131] En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 19 (HCDR1), SEQ ID NO: 20 (HCDR2) y SEQ ID NO: 21 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 22 (LCDR1), SEQ ID NO: 23 (LCDR2) y SEQ ID NO: 24 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 25 (HCDR1), SEQ ID NO: 26 (HCDR2) y SEQ ID NO: 27 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 28 (LCDR1), SEQ ID NO: 29 (LCDR2) y SEQ ID NO: 30 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT.

[00132] En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido

nucleico de la SEQ ID NO: 31, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32.

[00133] En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 33 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 34.

[00134] En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 35, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 36.

[00135] En diversas realizaciones, el anticuerpos anti-mesotelina o fragmento de unión a antígeno es 345A12-HC15-LC4.

[00136] Los dominios de unión a antígeno anti-mesotelina descritos en este documento pueden ser útiles solos (por ejemplo, como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno), unidos a uno o más agentes adicionales (por ejemplo, como los ADC) o como parte de una macromolécula más grande (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico).

[00137] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente

quimioterapéutico es la eribulina. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un dímero de eribulina.

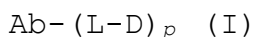
[00138] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un dominio de unión a antígeno en, y/o es parte de, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico o multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que es capaz de unirse a la mesotelina y comprende tres HCDR que comprenden secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y SEQ ID NO: 3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) y SEQ ID NO: 6 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) y SEQ ID NO: 9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) y SEQ ID NO: 12 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico comprende uno o más dominios de unión a antígeno adicionales, por ejemplo, para el mismo antígeno (es decir, mesotelina) o para otros antígenos.

[00139] En algunas realizaciones, un dominio de unión a antígeno es un fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno y/o fragmento de unión a antígeno es un fragmento variable monocatenario (scFv) o un fragmento Fab.

[00140] En algunas realizaciones, los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, los dominios de unión a antígeno anti-mesotelina) divulgados en el presente documento, para su uso solos o como parte de una macromolécula más grande, pueden incluir modificaciones adicionales (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones) al tiempo que conservan la función de unión a la mesotelina.

Conjugados de anticuerpo y fármaco

10 [00141] En el presente documento se proporcionan, además, en diversas realizaciones, compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) que comprenden un enlazador que conecta una fracción de fármaco quimioterapéutico, por ejemplo, eribulina, a un anticuerpo anti-mesotelina
15 divulgado en el presente documento. Los compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) pueden representarse mediante la Fórmula I:



20 en donde Ab es un anticuerpo anti-mesotelina que se internaliza divulgado en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno que se internaliza del mismo;

D es eribulina;

L es un enlazador escindible que conecta covalentemente Ab a D; y

25 p es un número entero de 1 a 8.

[00142] Los compuestos de ADC de la presente divulgación incluyen una fracción de anticuerpo (que incluye un fragmento de unión a antígeno del mismo) conjugado (por ejemplo, conectado covalentemente por un enlazador) a una
30 fracción de fármaco (por ejemplo, una eribulina), en donde la fracción de fármaco, cuando no está conjugada con una

fracción de anticuerpo tiene un efecto citotóxico o citostático. En diversas realizaciones, la fracción de fármaco presenta una citotoxicidad reducida o nula cuando se une a un conjugado, pero retoma la citotoxicidad después de la escisión del enlazador y de la fracción de anticuerpo. En diversas realizaciones, la fracción de fármaco presenta una destrucción por vecindad reducida o nula cuando está unida a un conjugado, pero presenta una destrucción por vecindad aumentada después de la escisión de un conjugado.

10 **[00143]** En algunas realizaciones, los compuestos de ADC divulgados en el presente documento pueden suministrar selectivamente una dosis eficaz de una fracción de fármaco (por ejemplo, eribulina) a células cancerosas o a tejidos tumorales que expresan un antígeno que es diana de la fracción de anticuerpo del ADC (por ejemplo, mesotelina). En algunas realizaciones, los compuestos de ADC divulgados se dirigen específicamente a un cáncer al suministrar eribulina a las células o a tejidos que expresan mesotelina sin afectar a las células o tejidos normales que no expresan mesotelina o que expresan mesotelina a niveles mucho más bajos. En algunas realizaciones, los compuestos de ADC divulgados han una destrucción específica mejorada y/o una destrucción inespecífica reducida, en comparación con un ADC que comprende un anticuerpo, enlazador y/o fracción de fármaco alternativos, por ejemplo, BAY 94-9343. En algunas realizaciones, los compuestos de ADC divulgados tienen una retención de la actividad de ADCC por el ADC mejorada, en comparación con un ADC que comprende un anticuerpo, enlazador y/o fracción de fármaco alternativos, por ejemplo, BAY 94-9343. En algunas realizaciones, los compuestos de ADC divulgados tienen una estabilidad mejorada (por ejemplo,

15

20

25

30

estabilidad en plasma), en comparación con un ADC que comprende un anticuerpo, enlazador y/o fracción de fármaco alternativos, por ejemplo, BAY 94-9343. En algunas realizaciones, los compuestos de ADC divulgados tienen una
5 eficacia antitumoral mejorada, en comparación con un ADC que comprende un anticuerpo, enlazador y/o fracción de fármaco alternativos, por ejemplo, BAY 94-9343.

[00144] En algunas realizaciones, los compuestos de ADC divulgados en el presente documento pueden proporcionar
10 una eficacia antitumoral favorable con una dosis más baja de eribulina, en comparación con la dosis de eribulina cuando se evalúa como un fármaco independiente (es decir, no conjugado con una fracción de anticuerpo). En algunas realizaciones, el direccionamiento específico de tumor de
15 los compuestos de ADC divulgados en el presente documento aumenta la actividad antitumoral y/o disminuye la citotoxicidad inespecífica del ADC, en comparación con la eribulina cuando se evalúa como un fármaco independiente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los compuestos de ADC
20 divulgados en el presente documento muestran una actividad antitumoral favorable con una dosis de eribulina que es al menos 10 veces menor, al menos 15 veces menor, al menos 20 veces menor o al menos 30 veces menor que la dosis de eribulina cuando se evalúa como fármaco independiente. En
25 algunas realizaciones, los compuestos de ADC divulgados demuestran una actividad antitumoral que es comparable o superior a la actividad de la eribulina cuando se evalúan como un fármaco independiente, al tiempo que proporcionan un perfil toxicológico o de seguridad mejorado sobre el de la
30 eribulina por sí sola.

[00145] En algunas realizaciones, el enlazador es estable fuera de una célula, de modo que el ADC permanece intacto cuando está presente en condiciones extracelulares, pero es capaz de escindirse al internalizarse en una célula, por ejemplo, una célula cancerosa. En algunas realizaciones, una fracción de fármaco de eribulina se escinde de una fracción de anticuerpo anti-mesotelina cuando el ADC entra en una célula que expresa mesotelina, y la escisión libera una forma no modificada de la eribulina.

10 [00146] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una fracción escindible que se coloca de manera que ninguna parte del enlazador o de la fracción de anticuerpo permanece unida a la fracción de fármaco de eribulina tras la escisión. En algunas realizaciones, la fracción escindible en el enlazador es una fracción peptídica escindible. En algunas realizaciones, un ADC que comprende una fracción peptídica escindible demuestra niveles de agregación más bajos, una relación de anticuerpo:fármaco mejorada, una destrucción específica de células cancerosas aumentada, una destrucción inespecífica de células no cancerosas disminuida y/o una mayor carga de fármaco (p) en relación con un ADC que comprende una fracción de enlazador alternativa. En algunas realizaciones, la potencia y/o la citotoxicidad aumentadas se proporcionan en un cáncer que expresa niveles moderados de mesotelina. En algunas realizaciones, la fracción peptídica escindible es escindible por una enzima, y el enlazador es un enlazador escindible por enzima. En algunas realizaciones, la enzima es catepsina B y el enlazador es un enlazador escindible por catepsina. En algunas realizaciones, el enlazador escindible por enzima (por ejemplo, el enlazador escindible por

catepsina) presenta una o más de las propiedades mejoradas mencionadas anteriormente, en comparación con un mecanismo de escisión alternativo.

[00147] En algunas realizaciones, la fracción
5 peptídica escindible en el enlazador comprende una unidad de aminoácidos. En algunas realizaciones, la unidad de aminoácidos comprende valina-citrulina (Val-Cit). En algunas realizaciones, un ADC que comprende Val-Cit demuestra estabilidad aumentada, una destrucción de células
10 inespecífica disminuida, una destrucción de células específica aumentada, niveles de agregación más bajos y/o una mayor carga de fármaco en relación con un ADC que comprende una unidad de aminoácidos alternativa o una fracción escindible alternativa.

15 [00148] En algunas realizaciones, el enlazador comprende al menos una unidad espaciadora que une la fracción de anticuerpo a la fracción escindible. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora en el enlazador puede comprender al menos una fracción de polietilenglicol (PEG).
20 La fracción de PEG puede, por ejemplo, comprender $-(\text{PEG})_m-$, en donde m es un número entero de 1 a 10. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora en el enlazador comprende $(\text{PEG})_2$. En algunas realizaciones, un ADC que comprende una unidad espaciadora más corta (por ejemplo,
25 $(\text{PEG})_2$) demuestra niveles de agregación más bajos y/o una carga de fármaco más alta en relación con un ADC que comprende una unidad espaciadora más larga (por ejemplo, $(\text{PEG})_8$) a pesar de la longitud más corta del enlazador.

[00149] En algunas realizaciones, la unidad
30 espaciadora en el enlazador se conecta a la fracción de anticuerpo del ADC a través de una fracción de maleimida

(Mal). En algunas realizaciones, un ADC que comprende un enlazador conectado a la fracción de anticuerpo a través de una Mal demuestra una mayor carga de fármaco en relación con un ADC que comprende un enlazador unido al resto de anticuerpo a través de una fracción alternativa. En algunas realizaciones, la Mal del enlazador se une a la fracción del anticuerpo a través de un resto de cisteína (por ejemplo, LCcys80). En algunas realizaciones, la Mal del enlazador se une a un resto de cisteína (por ejemplo, LCcys80) de una región variable de cadena ligera en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, p es 2 y las dos fracciones -L-D están conectadas al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, cada fracción -L-D está conectada a un resto de cisteína (por ejemplo, LCcys80) de una región variable de cadena ligera en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el resto de cisteína es una LCcys80. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora Mal comprende una fracción de PEG. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Mal-(PEG)_m, por ejemplo, Mal-(PEG)₂. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora Mal conecta la fracción de anticuerpo a la fracción escindible en el enlazador. En algunas realizaciones, la fracción escindible en el enlazador es una fracción peptídica escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit.

[00150] En algunas realizaciones, la fracción escindible en el enlazador se une directamente a la fracción de fármaco de eribulina del ADC, y la fracción escindible está conectada directamente a la fracción de anticuerpo o conectada a través de una unidad espaciadora. En algunas

realizaciones, una unidad espaciadora también conecta la fracción escindible en el enlazador a la fracción de fármaco de eribulina. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora que conecta la fracción escindible en el enlazador a la fracción de fármaco de eribulina es autoinmolable. En algunas realizaciones, el espaciador autoinmolable es capaz de liberar eribulina no modificada en una célula diana. En algunas realizaciones, la unidad espaciadora autoinmolable comprende un alcohol *p*-aminobencilo, por ejemplo, *p*-aminobenciloxicarbonilo (pAB). El pAB del enlazador, en algunas realizaciones, conecta la fracción escindible a la fracción de fármaco de eribulina. En algunas realizaciones, la fracción escindible es una fracción peptídica escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Val-Cit-pAB. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Val-Cit-pAB y una unidad espaciadora de PEG que une el enlazador a la fracción de anticuerpo a través de la Mal.

[00151] En algunas realizaciones, *p* es un número entero de 1 a 8, o de 2 a 6. En algunas realizaciones, *p* es 2 o 6. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB y *p* es 2. En algunas realizaciones, el enlazador comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB y *p* es 6.

[00152] En algunas realizaciones, la fracción de anticuerpo se conjuga con la fracción de fármaco de eribulina a través de un enlazador que comprende una fracción de Mal, una fracción de PEG, Val-Cit y un pAB. En estas realizaciones, la fracción de maleimida conecta

covalentemente la fracción enlazador-fármaco a la fracción de anticuerpo, y el pAB actúa como una unidad espaciadora autoinmolable. Dicho enlazador puede denominarse el enlazador "Mal-VC-pAB", el enlazador "Mal-VCP", "maleimida-VCP" o "VCP", el enlazador "Mal-(PEG)₂-VCP", o el enlazador "Mal-(PEG)₂-Enlazador Val-Cit-pAB". En algunas realizaciones, la fracción de fármaco de eribulina es eribulina unida covalentemente en la posición C-35. En algunas realizaciones, el pAB del enlazador Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB está conectado a la amina C-35 en la fracción de fármaco de eribulina.

[00153] 345A12-HC15-LC4 es un anticuerpo anti-mesotelina ilustrativo que comprende o está codificado por las secuencias mostradas anteriormente en las Tablas 1-10, por ejemplo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la fracción de anticuerpo de los ADC divulgados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la fracción de anticuerpo de los ADC divulgados en el presente documento es 345A12-HC15-LC4.

[00154] En algunas realizaciones, un ADC divulgado en el presente documento comprende 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina. En estas realizaciones, una fracción de anticuerpo que comprende 345A12-HC15-LC4 se une a una fracción de fármaco de eribulina a través de un enlazador

que comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. Dicho ADC puede denominarse "MORAb-109". En algunas realizaciones, un ADC divulgado en el presente documento es MORAb-109.

[00155] En algunas realizaciones, un ADC divulgado en el presente documento es MORAb-109 y tiene un p de 2. En algunas realizaciones, cuando p es 2, el ADC puede denominarse "MORAb-109 (DAR2)". En otras realizaciones, un ADC divulgado en el presente documento es MORAb-109 y tiene un p de 6. En algunas realizaciones, cuando p es 6, el ADC puede denominarse "MORAb-109 (DAR6)".

[00156] En diversas realizaciones, el enlazador está diseñado para facilitar la destrucción por vecindad (la destrucción de células vecinas, por ejemplo, las que no expresan mesotelina) a través de la escisión después de la internalización celular y la difusión de la fracción de fármaco-enlazador y/o la fracción de fármaco solo a células vecinas. En algunas realizaciones, el enlazador estimula la internalización celular. En algunas realizaciones, el enlazador está diseñado para minimizar la escisión en el entorno extracelular y, por lo tanto, reducir la toxicidad en un tejido no específico (por ejemplo, tejido no canceroso), al tiempo que se conserva la unión del ADC al tejido diana y la destrucción por vecindad del tejido canceroso que no expresa un antígeno que sea diana de la fracción de anticuerpo de un ADC, pero rodea el tejido canceroso diana que expresa el antígeno. En algunas realizaciones, un enlazador que comprende una fracción de maleimida (Mal), una fracción de polietilenglicol (PEG), valina-citrulina (Val-Cit o "VC") y un pAB proporciona estas características funcionales. En algunas realizaciones, un enlazador que comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB es

particularmente eficaz para proporcionar estas características funcionales cuando se une a una fracción de anticuerpo y una fracción de fármaco de eribulina. En algunas realizaciones, un enlazador que comprende Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB es eficaz para proporcionar algunas o todas estas

5 Características funcionales cuando se une a una fracción de anticuerpo anti-mesotelina tal como 345A12-HC15-LC4 y a una fracción de fármaco de eribulina.

[00157] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-mesotelina o un fragmento de unión a antígeno comprende las

10 secuencias divulgadas en el presente documento (por ejemplo, que comprenden las seis CDR y/o los dominios variables de cadena ligera y pesada divulgados en las Tablas 1-3). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a

15 antígeno es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoespecífico o fragmento de unión a antígeno, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno, o un anticuerpo multiespecífico o fragmento de

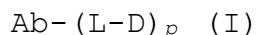
20 unión a antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un fragmento variable monocatenario (scFv) o un fragmento Fab.

[00158] En algunas realizaciones, un ADC que comprende una fracción de anticuerpo (Ab) anti-mesotelina y

25 una fracción de peptídica escindible demuestra niveles de agregación más bajos, una relación de anticuerpo:fármaco mejorada, una destrucción específica de células cancerosas aumentada, una destrucción inespecífica de células no cancerosas disminuida y/o una mayor carga de fármaco (p),

30 mayor citotoxicidad y/o potencia en relación con un ADC que comprende un anticuerpo alternativo o fragmento de unión a

antígeno. En algunas realizaciones, el ADC es un ADC de Fórmula (I):



5 en donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse a la mesotelina y comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y SEQ ID NO: 3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) y SEQ ID NO: 6 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones 15 determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) y SEQ ID NO: 9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) y SEQ ID NO: 12 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

D es un agente quimioterapéutico (por ejemplo, eribulina);

25 L es un enlazador escindible que conecta covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 8.

[00159] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable 30 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera

que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera kappa de Ig humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

15 **[00160]** En algunas realizaciones, el ADC tiene la Fórmula (I):

$$\text{Ab}-(\text{L-D})_p \text{ (I)}$$

en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse a la mesotelina y/o una célula que expresa mesotelina y comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y SEQ ID NO: 3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) y SEQ ID NO: 6 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) y SEQ ID NO: 9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (LCDR1),
5 SEQ ID NO: 11 (LCDR2) y SEQ ID NO: 12 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

D es una eribulina;

L es un enlazador escindible que conecta covalentemente Ab a D; y

10 p es un número entero de 1 a 8.

[00161] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se dirige a la mesotelina y/o a una célula que expresa mesotelina comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera kappa de Ig humana. En algunas realizaciones,
20 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

30 **[00162]** En algunas realizaciones, el ADC tiene la Fórmula (I):

$Ab-(L-D)_p$ (I)

en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se dirige a la mesotelina y/o a una célula que expresa mesotelina que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y SEQ ID NO: 3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) y SEQ ID NO: 6 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (las HCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) y SEQ ID NO: 9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (las LCDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) y SEQ ID NO: 12 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

D es una eribulina;

L es un enlazador escindible que comprende $Mal-(PEG)_2-Val-Cit-pAB$; y

p es un número entero de 1 a 8.

[00163] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se dirige a la mesotelina y/o a una célula que expresa mesotelina comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo o

fragmento de unión a antígeno comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera kappa de Ig humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una
5 región constante de cadena pesada de IgG1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región constante de cadena ligera kappa de Ig que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno
10 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

[00164] En algunas realizaciones, el ADC tiene la Fórmula (I):

15 $Ab-(L-D)_p$ (I)

en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse a la mesotelina y comprende una región variable de
20 cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

D es una eribulina;

L es un enlazador escindible que comprende $Mal-(PEG)_2-$
25 $Val-Cit-pAB$; y

p es un número entero de 1 a 8.

[00165] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana y una región constante de
30 cadena ligera kappa de Ig humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una

región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

[00166] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC es 345A12-HC15-LC4. En algunas realizaciones, *p* es 1 a 8. En algunas realizaciones, *p* es 2 o 6. En algunas realizaciones, *p* es 2.

[00167] En algunas realizaciones, un ADC divulgado en el presente documento (por ejemplo, uno que comprende un anticuerpo anti-mesotelina y un enlazador divulgado en el presente documento) con un nivel más bajo de carga de fármaco de eribulina (por ejemplo, un *p* de 2) puede suministrar niveles iguales o similares de eribulina a una célula cancerosa o a un tejido tumoral que un ADC con un nivel más alto de carga de fármaco (por ejemplo, un *p* de 6). En algunas realizaciones, un ADC con un nivel más bajo de carga de fármaco (por ejemplo, un *p* de 2) puede proporcionar una inhibición del crecimiento tumoral y/o una eficacia de tratamiento antineoplásico *in vivo* aproximadamente comparable o superior a las de un ADC con un mayor nivel de carga de fármaco (por ejemplo, un *p* de 6).

[00168] En algunas realizaciones, cada resto de eribulina se une mediante un enlazador escindible al anticuerpo dirigido a la mesotelina o fragmento de unión a antígeno a través de un resto de cisteína en el anticuerpo o fragmento (por ejemplo, LCcys80). En algunas

realizaciones, un total de dos fracciones de enlazador-eribulina se conectan al anticuerpo dirigido a la mesotelina o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, a través de dos restos de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (es decir, de manera que el ADC tiene una DAR2). En algunas realizaciones, el resto (o restos) de cisteína es/son LCcys80.

[00169] El desarrollo y la producción de un ADC para su uso como agente terapéutico humano, por ejemplo, como agente oncológico, puede precisar más que la identificación de un anticuerpo capaz de unirse a una diana o dianas deseadas y de conectarse con un fármaco utilizado por sí solo para tratar el cáncer. La unión del anticuerpo al fármaco puede tener efectos significativos e impredecibles sobre la actividad de uno o ambos, el anticuerpo y el fármaco, efectos que variarán dependiendo del anticuerpo y/o tipo de enlazador y/o fármaco elegido. En algunas realizaciones, por lo tanto, los componentes del ADC se seleccionan para (i) conservar una o más propiedades terapéuticas presentadas por las fracciones de anticuerpo y fármaco aisladas, (ii) retener las propiedades de unión específicas de la fracción de anticuerpo; (iii) optimizar la carga de fármaco y las relaciones de fármaco con respecto al anticuerpo; (iv) permitir el suministro, por ejemplo, el suministro intracelular, de la fracción de fármaco mediante la conexión estable a la fracción de anticuerpo; (v) conservar la estabilidad del ADC como un conjugado intacto hasta el transporte o suministro a un sitio diana; (vi) reducir al mínimo la agregación del ADC antes o después de la administración; (vii) permitir el efecto terapéutico, por ejemplo, un efecto citotóxico, de la fracción de fármaco

después de la escisión en el entorno celular; (viii) presentar una eficacia de tratamiento antineoplásico *in vivo* comparable o superior a la de las fracciones de anticuerpo y fármaco aisladas; (ix) reducir al mínimo la destrucción por vecindad por la fracción de fármaco y/o (x) presentar propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, una formulabilidad y perfiles toxicológicos/inmunitarios convenientes. Puede ser necesario el cribado de cada una de estas propiedades para identificar un ADC mejorado para el uso terapéutico (Ab et al. (2015) Mol. Cancer Ther. 14:1605-13).

[00170] En algunas realizaciones, un ADC divulgado en el presente documento que comprende un anticuerpo anti-mesotelina o un fragmento de unión a antígeno que se une a un quimioterapéutico, por ejemplo, eribulina, demuestra una combinación particular de propiedades convenientes. Estas propiedades incluyen, pero sin limitación, niveles eficaces de carga de fármaco, bajos niveles de agregación, estabilidad en condiciones de almacenamiento y/o cuando está en circulación en el cuerpo (por ejemplo, estabilidad en suero y en matriz), afinidad conservada por las células que expresan la diana, de manera comparable al anticuerpo no conjugado, potente citotoxicidad contra las células que expresan la diana, altos niveles de destrucción por vecindad y/o actividad antineoplásica *in vivo*, todo en comparación con los ADC que utilizan otras fracciones de anticuerpo. En algunas realizaciones, las altas actividades antineoplásicas de estos conjugados se observan incluso cuando se prueban en líneas celulares que tienen una expresión de antígeno moderada, lo que demuestra una potente sensibilidad a la carga útil de toxina suministrada por el ADC. En algunas

realizaciones, un ADC que comprende un anticuerpo anti-mesotelina o un fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento presenta una citotoxicidad y/o potencia antitumoral particularmente favorable, y perfiles
5 mejorados de toxicidad inespecífica y de metabolismo del fármaco y farmacocinética (DMPK, forma siglada de *drug metabolism and pharmacokinetic*) en comparación con un ADC que comprende una fracción de anticuerpo alternativa. En algunas realizaciones, un ADC que comprende un anticuerpo
10 anti-mesotelina humanizado divulgado en el presente documento y eribulina proporciona propiedades farmacológicas y toxicológicas sorprendentemente favorables en comparación con un ADC que comprende una fracción de anticuerpo y/o conjugado alternativo.

15 **[00171]** Los compuestos de ADC de la presente divulgación pueden suministrar selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico o citostático a las células cancerosas o al tejido tumoral. En algunas realizaciones, la actividad citotóxica y/o citostática del ADC depende del
20 nivel de expresión del antígeno diana en una célula. En algunas realizaciones, los ADC divulgados son particularmente eficaces para destruir células cancerosas que expresan un alto nivel de antígeno diana, en comparación con células cancerosas que expresan el mismo antígeno a un
25 nivel bajo. En algunas realizaciones, los ADC divulgados son particularmente eficaces para destruir células cancerosas que expresan el antígeno diana a un nivel moderado, en comparación con células cancerosas que expresan el mismo antígeno a un nivel bajo.

30 **[00172]** Los cánceres ilustrativos que expresan alta mesotelina incluyen, pero sin limitación, cáncer de ovario

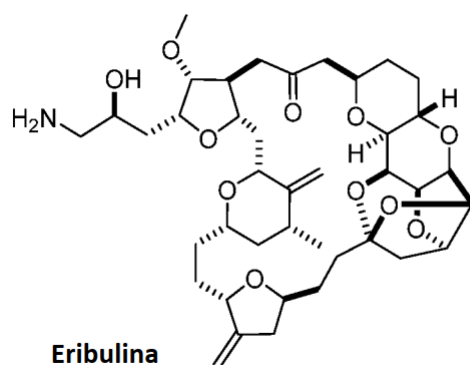
(por ejemplo, cáncer de ovario seroso, cáncer de ovario de células claras), cáncer de páncreas, mesotelioma, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón no microcítico (por ejemplo, adenocarcinoma) y cáncer colorrectal. Los cánceres
5 ilustrativos que expresan mesotelina moderada incluyen, pero sin limitación, cáncer gástrico, carcinoma tímico y carcinoma colangiocelular. Los cánceres ilustrativos que expresan baja mesotelina incluyen, pero sin limitación, melanoma y linfoma. En algunas realizaciones, los cánceres
10 que expresan mesotelina pueden incluir cánceres que albergan mutaciones y/o resistencia a fármacos, por ejemplo, cáncer de pulmón con mutación KRAS/STK11 (adenocarcinoma de pulmón de no microcítico), por ejemplo, los cánceres de pulmón con mutación que presentan resistencia al tratamiento con
15 bloqueo del punto de control PD-1.

Fracciones de fármaco

[00173] La fracción de fármaco (D) de los ADC descritos en el presente documento puede ser cualquier agente quimioterapéutico. Las clases útiles de agentes
20 quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, agentes anti-tubulina. En determinadas realizaciones, la fracción de fármaco es un agente anti-tubulina. Una fracción de fármaco ilustrativa para su uso en los ADC y composiciones descritos es la eribulina. Otra fracción de fármaco ilustrativa para
25 su uso en los ADC y composiciones descritos es un dímero de eribulina.

[00174] En diversas realizaciones, la estructura de la eribulina utilizada en su forma natural en los ADC divulgados es como se muestra en la Fórmula (II):

5

**Eribulina**

(II)

(II)

[00175] En diversas otras realizaciones, la estructura de la eribulina utilizada en los ADC divulgados es como se muestra en la Publ. N.º US 20180193478, que se incorpora en el presente documento por referencia para todas las estructuras de eribulina y métodos de síntesis de las estructuras.

15

20

25

30

Carga de fármaco

[00176] La carga de fármaco puede estar representada por p , y también se denomina en el presente documento relación de fármaco-anticuerpo (DAR). La carga de fármaco puede variar, por ejemplo, de 1 a 10 fracciones de fármaco por fracción de anticuerpo. En algunas realizaciones, p es un número entero de 1 a 10. En algunas realizaciones, p es un número entero de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 o de 1 a 2. En algunas realizaciones, p es un número entero de 2 a 10, de 2 a 9, de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En algunas realizaciones, p es un número entero de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es un número entero de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es un número entero de 2 a 6. En algunas realizaciones, p es 2. En algunas realizaciones, p es 6.

[00177] La carga de fármaco puede estar limitada, en algunas realizaciones, por el número de sitios de conexión en la fracción de anticuerpo. En algunas realizaciones, la fracción de enlazador (L) del ADC se conecta a la fracción de anticuerpo a través de un grupo químicamente activo en uno o más restos de aminoácido en la fracción de anticuerpo. Por ejemplo, el enlazador puede estar conectado a la fracción de anticuerpo a través de un grupo amino, imino, hidroxilo, tiol o carboxilo libre (por ejemplo, al extremo N o C, al grupo épsilon amino de uno o más restos de lisina, al grupo de ácido carboxílico libre de uno o más restos de ácido glutámico o ácido aspártico, o al grupo de sulfhidrilo de uno o más restos de cisteína). El sitio al que se conecta el enlazador puede ser un resto natural en la secuencia de aminoácidos de la fracción de anticuerpo, o puede

introducirse en la fracción de anticuerpo, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, introduciendo un resto de cisteína en secuencia de aminoácidos) o mediante bioquímica de proteínas (por ejemplo, por reducción, ajuste de pH o hidrólisis).

[00178] En algunas realizaciones, el número de restos de fármaco que se pueden conjugar con una fracción de anticuerpo está limitado por el número de restos de cisteína libres. Por ejemplo, cuando la conexión es un grupo tiol de cisteína, un anticuerpo puede tener solo uno o unos pocos grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o unos pocos grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede unirse un enlazador. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan estar unidos a una fracción de fármaco. De hecho, la mayoría de los restos tiol de cisteína en los anticuerpos están implicados en enlaces disulfuro intercatenarios o intracatenarios. La conjugación con cisteínas puede, por lo tanto, en algunas realizaciones, precisar al menos una reducción parcial del anticuerpo. La conexión excesiva del enlazador y la toxina a un anticuerpo, puede desestabilizar el anticuerpo al reducir los restos de cisteína disponibles para formar enlaces disulfuro. Por tanto, en algunas realizaciones, una relación óptima de fármaco:anticuerpo debería aumentar la potencia del ADC (al aumentar el número de fracciones de fármaco conectadas por anticuerpo) sin desestabilizar la fracción de anticuerpo. En algunas realizaciones, una relación óptima puede ser 2 o 6. En algunas realizaciones, una relación óptima es 2.

[00179] En algunas realizaciones, se utilizan una o más tecnologías de conjugación específicas de sitio para

producir un producto de ADC homogéneo con una carga de fármaco definida, es decir, una relación de fármaco con respecto al anticuerpo (DAR) definida. En algunas realizaciones, se pueden generar restos de cisteína libres en la cadena ligera o en la cadena pesada de los anticuerpos para la conjugación específica de sitio a través de la Tecnología de Conjugación Específica de Restos (RESPECT, forma siglada de *Residue-SPEcific Conjugation Technology*). Los protocolos ilustrativos para la generación de anticuerpos con formato RESPECT se describen en Albane et al. (2017) Cancer Biol. Ther. 18(5):347-57, y en las Pub. Int. N.º WO/2016205618 y WO/2017106643, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia para los métodos de realización de conjugación específica de sitio. En algunas realizaciones, se produce un ADC utilizando una conjugación específica de sitio para conectar covalentemente una fracción de anticuerpo a una fracción de fármaco a través de un enlazador (por ejemplo, un enlazador Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB). En algunas realizaciones, la conjugación específica de sitio se utiliza para tener como objetivo una DAR de aproximadamente 2 para los ADC o composiciones que comprenden una fracción de fármaco de eribulina.

[00180] Los anticuerpos monoclonales de conejo quimerizados o humanizados para regiones constantes humanas pueden producir cisteínas desapareadas dentro de la cadena ligera, dejando esos restos disponibles para la conjugación (Albane et al. (2017) Cancer Biol. Ther. 18(5):347-57; Pub. Int. n.º WO/2016205618). En algunas realizaciones, la fracción de anticuerpo utilizada para la conjugación específica de sitio es un anticuerpo con formato RESPECT-L.

En el presente documento se describen anticuerpos con formato RESPECT-L ilustrativos con una cisteína desapareada en la posición 80 de la cadena ligera (LCcys80). Como se usa en el presente documento, "LCcys80" o "Cys80" se refiere a un resto
5 de cisteína en la posición de aminoácido 80 de una región variable de cadena ligera en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Por ejemplo, en algunas realizaciones, en las regiones variables de cadena ligera divulgadas en el presente
10 documento, LCcys80 aparece en la posición de aminoácido 80. Los anticuerpos obtenidos por RESPECT-L pueden producir un ADC con una DAR de aproximadamente 2. En algunas realizaciones, se logra una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio de aproximadamente 2, por ejemplo,
15 utilizando conjugación específica de sitio.

Composiciones farmacéuticas

[00181] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos, fragmentos de unión a
20 antígeno, conjugados y/o ADC divulgados en el presente documento, y un transportador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden al menos un agente adicional.

25 [00182] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden múltiples copias de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado y/o ADC divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente
30 divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden múltiples copias de un ADC divulgado en el

presente documento. En algunas realizaciones, el *p* promedio de los ADC en una composición es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8. En algunas realizaciones, el *p* promedio de los ADC en la composición es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6. En algunas realizaciones, el *p* promedio de los ADC en la composición es de aproximadamente 1.3, aproximadamente 1.4, aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.6, aproximadamente 1.7, aproximadamente 1.8, aproximadamente 1.9, aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.1, aproximadamente 2.2 o aproximadamente 2.3. En algunas realizaciones, el *p* promedio de los ADC en la composición es de aproximadamente 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 o 6.5.

[00183] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes capaces de tratar un cáncer que expresa mesotelina, un esteroide y similares.

Usos terapéuticos y métodos de tratamiento

[00184] En el presente documento se divulgan métodos de uso de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, ADC y/o composiciones farmacéuticas divulgados en el tratamiento de un sujeto para un trastorno, por ejemplo, un trastorno oncológico. Los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados y/o ADC pueden administrarse solos o en combinación con un segundo agente terapéutico, y pueden administrarse en cualquier formulación, dosificación y esquema posológico farmacéuticamente aceptables. La eficacia del tratamiento con anticuerpos, fragmentos de unión a antígenos y/o ADC puede evaluarse en cuanto a la toxicidad, así como a los

indicadores de eficacia, y ajustarse en consecuencia. Las medidas de eficacia incluyen, pero sin limitación, un efecto citostático y/o citotóxico observado *in vitro* o *in vivo*, un volumen tumoral reducido, la inhibición del crecimiento tumoral y/o la supervivencia prolongada.

[00185] Se conocen métodos para determinar si un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC ejerce un efecto citostático y/o citotóxico en una célula. Por ejemplo, la actividad citotóxica o citostática de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC puede medirse exponiendo células de mamífero que expresan una proteína diana del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un período de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días y midiendo la viabilidad celular. También pueden utilizarse ensayos *in vitro* basados en células, para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de la apoptosis (activación de caspasa) del ADC.

[00186] Para determinar si un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC ejerce un efecto citostático, puede utilizarse un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, las células cancerosas que expresan un antígeno diana a una densidad de 5,000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos, pueden cultivarse durante un período de 72 horas y exponerse a 0.5 μ Ci de 3H-timidina durante las 8 horas finales del periodo de 72 horas. La incorporación de 3H-timidina en las células del cultivo se mide en presencia y ausencia del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC.

[00187] Para determinar la citotoxicidad, se puede medir la necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La necrosis suele acompañarse de una permeabilidad aumentada de la membrana plasmática; hinchazón de la célula y rotura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza normalmente por protuberancias en la membrana, condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos sobre las células cancerosas indica que un ADC es útil en el tratamiento de cánceres.

[00188] La viabilidad celular puede medirse, por ejemplo, determinando en una célula la captación de un colorante tal como rojo neutro, azul tripano, cristal violeta o azul ALAMAR™ (véase, por ejemplo, Page *et al.* (1993) Intl. J. Oncology 3:473-6). En tal ensayo, las células se incuban en un medio que contiene el colorante, las células se lavan y el colorante restante, que refleja la captación celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. En determinadas realizaciones, la potencia y/o citotoxicidad *in vitro* de los ADC preparados se evalúa utilizando un ensayo de cristal violeta. El cristal violeta es un colorante de triarilmetano que se acumula en el núcleo de las células viables. En este ensayo, las células se exponen a los ADC o agentes de control durante un período de tiempo definido, después del cual, las células se tiñen con cristal violeta, se lavan abundantemente con agua y después se solubilizan con SDS al 1 % y se leen espectrofotométricamente. El colorante de unión a proteínas sulforrodamina B (SRB) también puede utilizarse para medir la citotoxicidad (Skehan *et al.* (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

[00189] La apoptosis se puede cuantificar, por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN. Están disponibles métodos fotométricos en el mercado para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Los ejemplos de tales ensayos, incluido TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica (1999) N.º 2, pág. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

10 [00190] La apoptosis también se puede determinar midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como ocurre con la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática se puede determinar midiendo la captación de determinados colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas lo han descrito Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., eds. (1992) pág. 3.17.1-3.17.16). Las células también se pueden marcar con un colorante de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y pueden observarse las células en cuanto a la condensación de cromatina y la marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, condensación citoplásmica, aumento de protuberancias en la membrana y contracción celular.

[00191] Los ADC divulgados también pueden evaluarse en cuanto a la actividad de destrucción por vecindad. La actividad de destrucción por vecindad puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo que emplea dos líneas

celulares, una positiva para el antígeno diana y otra negativa para el antígeno diana. Las líneas celulares pueden marcarse para diferenciarlas. Por ejemplo, pueden cocultivarse células positivas para la diana marcadas con
5 Nuclight™ Green (NLG) y células negativas para la diana marcadas con Nuclight™ Red (NLR), tratarse con un ADC seguido de un control de la citotoxicidad. La destrucción de las células negativas para la diana cuando se mezclan con células positivas para la diana es un indicio de destrucción por
10 vecindad, mientras que la destrucción de las células negativas para la diana en ausencia de las células positivas para la diana es indicativa de destrucción inespecífica.

[00192] En algunas realizaciones, la presente divulgación presenta un método para destruir, inhibir o
15 modular el crecimiento de, o interferir con el metabolismo de, una célula o tejido canceroso mediante la desorganización de la tubulina. El método se puede utilizar con cualquier sujeto en el que la desorganización de la tubulina proporcione un beneficio terapéutico. Los sujetos que pueden
20 beneficiarse de la desorganización de la tubulina incluyen, entre otros, los que tienen o están en riesgo de tener cáncer gástrico, cáncer de ovario (por ejemplo, cáncer de ovario epitelial), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de mama, cáncer de endometrio (por
25 ejemplo, carcinoma de endometrio seroso), osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de testículo de células germinativas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer urotelial, cáncer de útero, cáncer de las vías biliares, leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena aguda), linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma
30 no hodkiniano), mieloma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer

de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma), cáncer tiroideo, cáncer colorrectal y/o cáncer de piel (por ejemplo, melanoma) o cualquier metástasis de los mismos (Dumontet y Jordan
5 (2010) Nat. Rev. Drug Discov. 9:790-803).

[00193] En diversas realizaciones, los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o ADC divulgados pueden administrarse en cualquier célula o tejido que exprese mesotelina, tal como una célula o tejido canceroso que
10 exprese mesotelina. Una realización ilustrativa incluye un método de inhibición de la señalización celular mediada por mesotelina o un método de destrucción de una célula. El método puede usarse con cualquier célula o tejido que exprese mesotelina, tal como una célula cancerosa o una lesión
15 metastásica. Los ejemplos no limitantes de cánceres que expresan mesotelina incluyen mesotelioma, cáncer de páncreas (por ejemplo, adenocarcinoma de páncreas), cáncer de ovario (por ejemplo, cáncer de ovario seroso, cáncer de ovario de células claras, cáncer de ovario epitelial) y cáncer de
20 pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón) (Wang et al. (2012) PLoS ONE 7:e33214). Otros cánceres con mesotelina ilustrativos incluyen cáncer de endometrio, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino,
25 cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer tiroideo, cáncer urotelial, cáncer de útero y cáncer de vías biliares. Los ejemplos no limitantes de células que expresan mesotelina incluyen células de carcinoma de ovario humano OVCAR3, células
30 endometrioides humanas HEC-251, células de mesotelioma de células escamosas de pulmón humano H226 y células que

comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica mesotelina o una porción de la misma.

[00194] Los métodos ilustrativos incluyen las etapas de poner en contacto una célula con un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC, como se describe en el presente documento, en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad suficiente para destruir la célula. El método puede utilizarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* o *in situ*. Por ejemplo, las células que expresan mesotelina (por ejemplo, células recogidas por biopsia de un tumor o lesión metastásica; células de una línea celular cancerosa establecida; o células recombinantes), pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo y la etapa de la puesta en contacto puede verse afectada por la adición del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno y/o el ADC al medio de cultivo. El método dará como resultado la destrucción de células que expresan mesotelina, incluyendo en particular células tumorales que expresan mesotelina. Alternativamente, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno y/o el ADC pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración adecuada (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o contacto directo con un tejido tumoral) para tener un efecto *in vivo*. Este enfoque también puede utilizarse para anticuerpos y los ADC dirigidos a otros antígenos de superficie celular.

[00195] El efecto *in vivo* de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o composición terapéutica de ADC divulgados puede evaluarse en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, pueden utilizarse modelos de cáncer xenogénicos, en donde se introducen explantes de cáncer o tejidos de xenoinjertos pasados en animales inmunocomprometidos, tales

como ratones lampiños o IDCG (Klein *et al.* (1997) *Nature Med.* 3:402-8). La eficacia puede predecirse usando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, la regresión o metástasis tumoral y similares.

5 **[00196]** También se pueden utilizar ensayos *in vivo* que evalúen el estímulo de la muerte tumoral por mecanismos tales como la apoptosis. En algunas realizaciones, los xenoinjertos de ratones portadores de tumores tratados con la composición terapéutica pueden examinarse para determinar
10 la presencia de focos apoptóticos y compararlos con ratones portadores que portan xenoinjertos de control no tratados. El grado en el que se encuentran focos apoptóticos en los tumores de los ratones tratados proporciona una indicación de la eficacia terapéutica de la composición.

15 **[00197]** En el presente documento se proporcionan además métodos de tratamiento de un cáncer. Los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o ADC divulgados en el presente documento pueden administrarse a un mamífero no humano o a un sujeto humano con fines terapéuticos. Los
20 métodos terapéuticos implican administrar a un mamífero que tiene un tumor una cantidad biológicamente eficaz de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC que comprende eribulina unida a un anticuerpo dirigido que se une a un antígeno expresado, es accesible a la unión o está
25 localizado en la superficie de una célula cancerosa.

[00198] Una realización ilustrativa es un método de suministro de eribulina a una célula que expresa mesotelina, que comprende conjugar eribulina con un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de la mesotelina y
30 exponer la célula al anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC. Los ejemplos de células tumorales que

expresan mesotelina para las que se indican los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC de la presente divulgación incluyen células de carcinoma de ovario, células endometrioides y células de mesotelioma de células escamosas de pulmón.

5 **[00199]** Otra realización ilustrativa es un método de reducción o inhibición del crecimiento de un tumor que expresa un antígeno diana (por ejemplo, un tumor que expresa mesotelina), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC. En algunas realizaciones, el tratamiento es suficiente para reducir o inhibir el crecimiento del tumor del paciente, reducir el número o el tamaño de las lesiones metastásicas, reducir la carga tumoral, reducir la carga tumoral primaria, reducir la invasividad, prolongar el tiempo de supervivencia y/o mantener o mejorar la calidad de vida. En algunas realizaciones, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con el anticuerpo o la fracción de unión a antígeno del ADC cuando se administra solo, y/o el tumor es insensible o resistente al tratamiento con eribulina cuando se administra sola.

15 **[00200]** Además, los anticuerpos de la presente divulgación pueden administrarse a un mamífero no humano que expresa mesotelina con fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a lo último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC divulgados (por ejemplo, prueba de dosificación y evolución temporal de la administración).

30 **[00201]** Además, en el presente documento se proporcionan usos terapéuticos de los anticuerpos,

fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC divulgados. Una realización ilustrativa es el uso de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC en el tratamiento de un cáncer que expresa un antígeno diana (por ejemplo, un cáncer que expresa mesotelina). Los métodos para identificar sujetos que tienen cánceres que expresan un antígeno diana (por ejemplo, mesotelina) son conocidos en la técnica y pueden usarse para identificar pacientes adecuados para el tratamiento con un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC divulgados.

[00202] Otra realización ilustrativa es el uso de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC en un método de fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa un antígeno diana (por ejemplo, un cáncer que expresa mesotelina).

[00203] Las composiciones terapéuticas utilizadas en la práctica de los métodos anteriores pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un transportador farmacéuticamente aceptable adecuado para el método de suministro deseado. Una realización ilustrativa es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC de la presente divulgación y un transportador farmacéuticamente aceptable. Los transportadores adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con la composición terapéutica, conserva la función antitumoral de la composición terapéutica y generalmente no reacciona con el sistema inmunitario del paciente.

[00204] Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes

antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o
5 más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, sal de mesilato y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, se incluyen en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol,
10 sorbitol o cloruro de sodio. Los transportadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia del ADC.

15 **[00205]** Las formulaciones terapéuticas pueden solubilizarse y administrarse por cualquier vía capaz de suministrar la composición terapéutica al sitio del tumor. Las vías de administración potencialmente eficaces incluyen, pero sin limitación, la intravenosa, parenteral,
20 intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraorgánica, ortotópica y similares. Las preparaciones de proteínas terapéuticas pueden liofilizarse y almacenarse como polvos estériles, por ejemplo, al vacío, y a continuación reconstituirse en agua bacteriostática (que
25 contiene, por ejemplo, conservante de alcohol bencílico) o en agua estéril antes de la inyección. Las formulaciones terapéuticas pueden comprender un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno y/o ADC o una de sales farmacéuticamente aceptable de los mismos, por ejemplo, una sal de mesilato.

30 **[00206]** Los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC divulgados en el presente documento

pueden administrarse en una dosis que varía de aproximadamente 0.2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg a un paciente que lo necesite. En algunas realizaciones, se administra al paciente un anticuerpo, fragmento de unión a
5 antígeno y/o ADC a diario, cada dos meses o en cualquier período de tiempo intermedio. Las dosis y los protocolos de administración para el tratamiento de cánceres utilizando los métodos anteriores variarán con el método y el cáncer diana, y generalmente dependerán de una serie de otros
10 factores apreciados en la técnica.

[00207] Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar uno o más anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC de la presente divulgación. Los métodos de administración de
15 los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC incluyen, pero sin limitación, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración por mucosas
20 (por ejemplo, vías intranasal y oral). Además, se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, las composiciones y métodos para la administración pulmonar descritos en las
25 patentes de EE.UU. N.º 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540 y 4,880,078; y Publ. Int. N.º WO 1992/019244, WO 1997/032572, WO 1997/044013, WO 1998/031346 y WO 1999/066903. Los ADC pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo,
30 por infusión o inyección en embolada, o por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por

ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local.

[00208] Las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. En algunas realizaciones, uno o más de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígenos y/o los ADC, o composiciones farmacéuticas, se suministran como un polvo seco esterilizado liofilizado o concentrados sin agua en un recipiente cerrado herméticamente, y se pueden reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En algunas realizaciones, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente cerrado herméticamente en una dosificación unitaria de al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg, o cualquier cantidad intermedia. En algunas realizaciones, los anticuerpos liofilizados, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC o composiciones farmacéuticas se almacenan a entre 2 °C y 8 °C en el recipiente original. En algunas realizaciones, uno o más de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC o composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento se suministran en forma líquida en un recipiente cerrado herméticamente, por ejemplo, un recipiente que indica la cantidad y concentración del agente. En algunas realizaciones, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente cerrado herméticamente de al menos 0.25 mg/ml, al menos 0.5 mg/ml,

al menos 1 mg/ml, al menos 2.5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml de ADC. La forma líquida se puede almacenar entre
5 2 °C y 8 °C en el recipiente original.

[00209] En algunas realizaciones, los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC divulgados pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. La solución inyectable puede
10 estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de vidrio de pedernal o ámbar, ampolla o jeringa precargada u otro dispositivo de suministro o almacenamiento conocido.

[00210] Las composiciones descritas en el presente
15 documento pueden estar en una diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y
20 supositorios. La forma depende del modo de administración y aplicación terapéutica previstos.

[00211] En diversas realizaciones, el tratamiento implica una inyección en embolada única o la administración repetida del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o
25 preparación de ADC a través de una vía de administración aceptable.

[00212] Los pacientes pueden evaluarse en cuanto a los niveles de antígeno diana en una muestra dada (por ejemplo, los niveles de células que expresan el antígeno
30 diana) para ayudar a determinar el esquema posológico más eficaz, etc. Una realización ilustrativa es un método de

determinación de si un paciente será sensible al tratamiento con un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC de la presente divulgación, que comprende proporcionar una muestra biológica del paciente y poner en contacto la muestra
5 biológica con el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC. Las muestras biológicas ilustrativas incluyen un tejido o líquido corporal, tal como un exudado inflamatorio, sangre, suero, líquido intestinal, muestra de heces o biopsia de tumor (por ejemplo, una biopsia de tumor obtenida de un
10 paciente que tiene o está en riesgo de tener un cáncer que expresa un antígeno diana, por ejemplo, un cáncer que expresa mesotelina). En algunas realizaciones, puede obtenerse una muestra (por ejemplo, un tejido y/o líquido corporal) de un sujeto, y puede utilizarse un método inmunológico adecuado
15 para detectar y/o medir la expresión de proteínas del antígeno diana (por ejemplo, la mesotelina). Dichas evaluaciones también se utilizan con fines de control a lo largo de la terapia, y son útiles para determinar el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros
20 parámetros.

[00213] En algunas realizaciones, la eficacia de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC puede evaluarse poniendo en contacto una muestra de tumor de un sujeto con el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o
25 ADC, y evaluando la tasa de crecimiento o el volumen tumorales. En algunas realizaciones, cuando se ha determinado que un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y/o ADC es eficaz, puede administrarse al sujeto.

[00214] Los enfoques terapéuticos anteriores se
30 pueden combinar con una cualquiera de una amplia diversidad de regímenes quirúrgicos, de quimioterapia o radioterapia

adicionales. En algunas realizaciones, los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC o las composiciones divulgadas en el presente documento se coformulan y/o coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas de nitrógeno, compuestos de etilenimina y alquil sulfonato; antimetabolitos, por ejemplo, antagonistas de ácido fólico, purina o pirimidina; agentes antimitóticos, por ejemplo, agentes anti-tubulina tales como eribulina o mesilato de eribulina (Halaven™), alcaloides de la vinca y auristatinas; antibióticos citotóxicos; compuestos que dañan o interfieren con la expresión o replicación del ADN, por ejemplo, agentes de unión al surco menor del ADN; y antagonistas de receptores de factores de crecimiento. En algunas realizaciones, un agente quimioterapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, agentes antimitóticos, tales como la eribulina o mesilato de eribulina (Halaven™), auristatinas (por ejemplo, monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF)), maitansinoides (por ejemplo, maitansina), dolastatinas, duostatinas, criptoficinas, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina), taxanos, taxoles y colchicinas; antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, dihidroxiantracindiona); antibióticos citotóxicos (por ejemplo, mitomicinas, actinomicinas, duocarmicinas (por ejemplo, CC-1065), auromicinas, duomicinas, caliqueamicinas, endomicinas, fenomicinas); agentes alquilantes (por ejemplo, cisplatino); agentes

intercalantes (por ejemplo, bromuro de etidio); inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido, tenopósido); radioisótopos, tales como At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212 o 213, P32, e isótopos radioactivos de lutecio (por ejemplo, Lu177), y toxinas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal (por ejemplo, ricina (por ejemplo, cadena A de ricina), toxina diftérica, exotoxina A de *Pseudomonas* (por ejemplo, PE40), endotoxina, mitogelina, combrestatina, restrictocina, gelonina, sarcina alfa, abrina (por ejemplo, cadena A de abrina), modecina (por ejemplo, cadena A de modecina), curicina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, glucocorticoide).

[00215] También se describen en el presente documento los usos de uno o más de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o los ADC divulgados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, los ADC divulgados en el presente documento se usan para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

[00216] En diversas realizaciones, los kits para su uso en el laboratorio y las aplicaciones terapéuticas descritas en el presente documento están dentro del alcance de la presente divulgación. Dichos kits pueden comprender una bolsa, envase o recipiente que está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados a utilizar en un método divulgado en el presente documento, junto con una etiqueta o prospecto que comprenda instrucciones de uso, tales como el uso descrito en el presente documento. Los kits pueden comprender

un recipiente que comprenda una fracción de fármaco. La presente divulgación también proporciona uno o más de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y/o de los ADC, o composiciones farmacéuticas de los mismos, envasados en un
5 recipiente con cierre hermético, tal como una ampolla o sobre, que indique la cantidad del agente.

[00217] Los kits pueden comprender el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes asociados con el mismo que comprendan materiales convenientes desde un
10 punto de vista comercial y del usuario, incluidos tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas; etiquetas de bolsa, envase, recipiente, vial y/o tubo que enumeren los contenidos y/o las instrucciones de uso, y prospectos con instrucciones de uso.

15 [00218] Puede haber una etiqueta en o con el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia específica o una aplicación no terapéutica, tal como una aplicación de pronóstico, profiláctica, de diagnóstico o de laboratorio. Una etiqueta también puede indicar
20 instrucciones para el uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas en el presente documento. También se pueden incluir instrucciones u otra información en un inserto (o insertos) o una etiqueta (o etiquetas), que se incluyen con o en el kit. La etiqueta puede estar sobre o asociada con el
25 recipiente. Una etiqueta puede estar sobre un recipiente cuando las letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta están moldeados o grabados en el propio recipiente. Una etiqueta puede estar asociada a un recipiente cuando está presente dentro de un receptáculo o bolsa que también
30 contiene el recipiente, por ejemplo, tal como un prospecto de envase. La etiqueta puede indicar que la composición se

utiliza para el diagnóstico o el tratamiento de una afección, tal como un cáncer que se describe en el presente documento.

[00219] Será evidente para los expertos en la materia que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención descritos en el presente documento son obvias y pueden hacerse utilizando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o las realizaciones descritas en el presente documento. Habiendo descrito ahora la invención en detalle, la misma se entenderá más claramente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Generación de anticuerpos quiméricos contra la mesotelina humana

[00220] Se generaron anticuerpos quiméricos que contenían secuencias de inmunoglobulina humanas y de conejo de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación. Se analizó la unión de los anticuerpos a la mesotelina humana y la unión a epítopos. La citotoxicidad inicial del ADC de los anticuerpos anti-mesotelina quiméricos recombinantes se evaluó en líneas celulares humanas que expresaban niveles variables de mesotelina. Los anticuerpos principales para la humanización y el desarrollo de ADC se describen en los Ejemplos 2-3.

1.1 Reactivos y materiales

1.1.1 Anticuerpos

[00221] Los anticuerpos utilizados en los siguientes estudios son la forma quimérica (-xi) conejo-humano de anticuerpos anti-mesotelina humana y tienen una cisteína desapareada en la posición 80 de la cadena ligera (LCcys80).

Los anticuerpos se purificaron y descisteinilaron como se describe a continuación en la Sección 1.5. El contenido de proteínas final se evaluó mediante ensayo de BCA y SDS-PAGE.

1.1.1.2 Citotoxinas conjugables y ADC con LCcys80

5 **[00222]** Los compuestos de enlazador-citotoxina utilizados en los siguientes estudios incluyen Mal-PEG₂-Auristatina F. Los anticuerpos se conjugaron con Mal-PEG₂-Auristatina F en una relación molar de 1:5 (mAb:carga útil). Los anticuerpos con LCcys80 conjugados se purificaron
10 mediante cromatografía de desalado con columnas de desalado HiTrap de 2x5 ml (GE Healthcare) en un FPLC AKTA, utilizando DPBS 1X como tampón de ejecución. El contenido de proteínas final se determinó mediante ensayo de BCA.

1.1.1.3 Líneas celulares tumorales

15 **[00223]** Las líneas de células tumorales humanas utilizadas en los análisis de los ADC quiméricos de conejo-humano incluyeron A431-K5 (células de melanoma humano A431 transfectadas de forma estable con mesotelina humana, MSLN^{alta}), A431 (MSLN^{baja}), y OVCAR3 (carcinoma de ovario
20 humano, MSLN^{alta}). Las células A431-K5 se obtuvieron del National Cancer Institute. Las líneas celulares utilizadas se obtuvieron directamente de la American Type Culture Collection (ATCC).

1.1.1.4 Otros reactivos

25 **[00224]** Todos los reactivos utilizados se obtuvieron de proveedores comerciales de calidad de investigación o superior, a menos que se indique lo contrario.

1.2 Generación de anticuerpos en conejos contra la mesotelina humana

30 **[00225]** El ADNc de la mesotelina humana del vector p0301 se clonó en un vector de expresión de Aldevron (pB8-

mesotelina-hum). A continuación, se inmunizaron dos conejos con el vector de inmunización pB8-mesotelina-humana. Después de cuatro aplicaciones genéticas, se tomaron sueros inmunes el día 52 del protocolo de inmunización. El suero inmune de los conejos se diluyó 1:1000 o 1:5000 en PBS que contenía BSA al 1 % y se probó mediante citometría de flujo utilizando células de mamífero previamente transfectadas de forma transitoria con el ADNc de mesotelina humana clonado en un vector de expresión de Aldevron (pB1-mesothelin-hum) y células de mamífero transfectadas de forma transitoria con un ADNc irrelevante clonado en el mismo vector. A continuación, se detectaron los anticuerpos de los sueros inmunes con IgG anti-conejo de cabra R-ficoeritrina 10 µg/ml (Southern Biotech, n.º 4030-09). La inmunización, la citometría de flujo y la criopreservación de las células se realizaron en Aldevron (Dreiburg, Alemania).

1.3 Cribado de alto rendimiento de cultivos que producen anticuerpos anti-mesotelina

1.3.1 Cultivo celular

[00226] Células de ganglio linfático de conejo criopreservadas (2.0×10^7 células) se descongelaron y después se activaron con 2.5 µg/ml de lectina de *Phytolacca americana* y se recuperaron con ADNasa I durante una hora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células se sembraron a 5 células por pocillo en una placa de 384 pocillos con células alimentadoras (CHO que expresan CD154 de conejo) y se cultivaron en IMDM completo (IMDM complementado con SFB al 10 %, L-glutamina 2 mM, MEM 1X AANE, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 50 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml, 2-Me 55 µM) que contenía IL2 humana 10.5 ng/ml y citoquinas IL21 humana 10.5 ng/ml (PeproTech).

1.3.2 Aislamiento de IgG de conejo y anticuerpos policlonales contra mesotelina humana

[00227] En la semana 2, los pocillos que producían anticuerpo IgG de conejo se identificaron mediante FRET para
5 IgG utilizando criptato de europio. Los pocillos que producían IgG se cribaron para detectar la presencia de anticuerpo Fcγ de IgG de conejo mediante ELISA frente a placas recubiertas con 1 µg/ml de CHO-MT40 mesotelina. Los cultivos que producían IgG de conejo específica de mesotelina
10 se confirmaron mediante cribado por ELISA frente a 1 µg/ml de mesotelina y se contracribaron frente a 1 µg/ml de CD73-his. Se realizaron FRET y ELISA en el sistema robótico Biomek® FX (Beckman).

1.3.3 Rescate génico por ARNm de anticuerpos de conejo 15 contra la mesotelina humana

[00228] Se aisló ARN total de pocillos que producían anticuerpos IgG de conejo anti-mesotelina utilizando el kit RNAqueous™-96 Total RNA Isolation Kit (Ambion). Se sintetizó el ADNc y las regiones variables de las cadenas ligera y
20 pesada se amplificaron mediante PCR utilizando el kit Platinum Taq one step RT-PCR (Invitrogen), utilizando cebadores internos (Tabla 11). Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada se amplificaron con cebadores anidados (Tabla 12) utilizando el kit Platinum Taq
25 Amplification y un termociclador (40 ciclos, 1 min 94 °C, 1 min 54 °C, 1.5 min 68 °C). El molde de ADN amplificado se visualizó mediante electroforesis en gel, se purificó con el kit QIAquick 96 PCR Purification (Qiagen) y se determinó la secuencia de ADN mediante GeneWiz (South Plainfield, NJ)
30 utilizando cebadores del laboratorio (Tabla 13). Las secuencias de ADN se analizaron frente a las familias de

genes V y genes J de conejo (IMGT/V-QUEST) y frente a la base de datos de cebadores del laboratorio In-Fusion (Blastn). Los cebadores In-Fusion (Tabla 14) se identificaron o diseñaron conteniendo un enlazador de Fc humano añadido al extremo 5' para el cebador del gen V y J. Los cebadores se sintetizaron en IDT (Coralville, IA).

Tabla 11. Secuencias de cebadores utilizadas para RT-PCR de una etapa

Gen	Cebador 5'	Cebador 3'
Pesada	TYCTCCTGGTCRCTSYGCTC (SEQ ID NO: 37)	TTGGTGTTGGTGGCTGGGTG (SEQ ID NO: 38)
Ligera	GGGCCCCCACTCAGCTGCTG (SEQ ID NO: 39)	GTTBTACTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 40)

Tabla 12. Secuencias de cebadores utilizados para PCR

Gen	Cebador 5'	Cebador 3'
Pesada	TYCTCCTGGTCRCTSYGCTC (SEQ ID NO: 41)	TTGGTGTTGGTGGCTGGGTG (SEQ ID NO: 42)
Ligera	ACTCAGCTGCTGGGGCTCCT (SEQ ID NO: 43)	GTTBTACTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 44)

Tabla 13. Secuencias de cebadores utilizados para la secuenciación de moldes de ADN

Gen	Cebador 3'
Pesada	TTGGTGTTGGTGGCTGGGTG (SEQ ID NO: 45)
Ligera	GTTBTACTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 46)

Tabla 14. Secuencias de cebadores utilizados para la PCR In-Fusion para la muestra 345A12

Gen	Cebador 5'	Cebador 3'
Pesada	gccaccggcggtgcactccCAGTCGYTGG AGGAGTCCGGGGG (SEQ ID NO: 47)	gggcccttggtggatgcTGARGAGACRGTGA CSAGGGTSCC (SEQ ID NO: 48)
Ligera	gccaccggcggtgcactccGCCTATGATA TGACCCAGACTCCA (SEQ ID NO: 49)	agccacagttcgTTTGACSACCACCTCGGTC CC (SEQ ID NO: 50)

1.3.4 Fragmentos de PCR

[00229] Los dominios variables amplificados por PCR incluían 15 pares de bases en los extremos 5' y 3' homólogos al sitio de clonación dentro del vector de subclonación. Los fragmentos de PCR se subclonaron en un plásmido de expresión que contenía una región constante de gamma (p1974 pC+75IZ-ldr-InFusion-hugamma) o kappa (p1975 pC+75IB-ldr-InFusion-hukappa) humana utilizando un kit de clonación In-Fusion HD (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante. 1 µl de la reacción de In-Fusion se transformó en células Stellar Competent (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los transformantes se cultivaron en 1 ml de medio TB (Teknova) durante una noche a 37 °C en un agitador de placas de microtitulación. Al día siguiente, los cultivos se miniprepararon con un kit de minipreparaciones QIAprep 96 Turbo (Qiagen) utilizando un epMotion 5075 de acuerdo con el protocolo del fabricante.

1.3.5 Fragmentos por síntesis génica

[00230] Se optimizaron los codones de los dominios variables pesados y ligeros humanizados para la expresión en células de ovario de hámster chino (CHO) y se sintetizaron mediante GeneArt. Los dominios variables se sintetizaron con una secuencia de inicio de traducción de Kozak y una

secuencia líder de secreción de Ig, e incluyeron 15 pares de bases en los extremos 5' y 3' homólogos al sitio de clonación dentro del vector de subclonación. Los fragmentos de PCR sintetizados mediante GeneArt se subclonaron en un plásmido de expresión que contenía una región constante de gamma (p1974 pC+75IZ-ldr-InFusion-hugamma) o kappa ((p1975 pC+75IB-ldr-InFusion-hukappa) humana utilizando un kit de clonación InFusión HD (Clontech). Todos los clones se secuenciaron para confirmar la presencia y fidelidad de los insertos.

1.4 Producción transitoria de mAb

1.4.1 Células HEK

[00231] Por cada mililitro de 3×10^6 células a transfectar con ExpiFectamine (ThermoFisher), se incubaron 333.3 ng de plásmido de HC y 333.3 ng de plásmido de LC durante 5-10 min en 50 μ l de Opti-MEM (ThermoFisher). Asimismo, se incubaron 2.67 μ l de ExpiFectamine en 50 μ l de Opti-MEM. La solución de ExpiFectamine se añadió a la mezcla de ADN y se incubó durante 20-30 min a temperatura ambiente. La mezcla de ADN:ExpiFectamine se añadió a las células al tiempo que se agitaban, y se incubó a 37 °C, CO₂ al 8 %, agitando a 125 rpm. Al día siguiente, se añadieron a la transfección 5 μ l de potenciador 1 y 50 μ l de potenciador 2 por ml de células con incubación continua durante otros 7-10 días. Después de 48-72 horas, las células se alimentaron a una concentración final de levadura 10 g/l (BD Biosciences), ácido valérico 5 mM (Sigma-Aldrich) y concentrado de lípidos QD 1:100 (ThermoFisher).

1.4.2 Células CHO

[00232] Para cada mililitro de 6×10^6 células a transfectar con ExpiFectamine CHO (ThermoFisher), se

mezclaron 500 ng de plásmido de HC y 500 ng de plásmido de LC en Opti-PRO (ThermoFisher) en 40 µl de volumen total. Asimismo, se mezclaron 3.2 µl de ExpiFectamine CHO en 36.8 µl de Opti-PRO. La solución de ExpiFectamine CHO se añadió a la
5 mezcla de ADN y se incubó durante 1 - 5 min a temperatura ambiente. La mezcla de ADN:ExpiFectamine CHO se añadió a las células al tiempo que se agitaban, y se incubó a 37 °C, CO₂ al 8 %, agitando a 125 rpm. Al día siguiente, se añadieron a la transfección 6 µl de potenciador y 160 µl de alimento
10 por ml de células, y las células se transfirieron a 32 °C, CO₂ al 5 %. En el día 5, se añadieron 160 µl adicionales de alimentación por ml de células. En los días 12 a 14, se recogieron los sobrenadantes.

1.5 Purificación y descisteinilación de mAb

15 1.5.1 Purificación de anticuerpos

[00233] Se equilibró resina Prosep-vA High Capacity Protein A (Millipore) con DPBS y se añadieron 50 µl a 2 ml de muestra. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, el medio y la resina se añadieron a una placa
20 de filtro y se lavaron dos veces con 1 ml de DPBS. La muestra se eluyó de la resina mediante la adición de 400 µl de glicina 0.1 M, pH 2.9, seguido de centrifugación a 15,000 x g durante 30 segundos. La muestra se neutralizó con 20 µl de Tris 1 M, pH 8.0. Las muestras se concentraron a
25 aproximadamente 100 µl por centrifugación a 15,000 x g durante 5 min utilizando filtros de límite de 10 k, Amicon Ultra de 0.5 ml, (Millipore) y el tampón se cambió a DPBS utilizando columnas de desalinización Zeba de 0.5 ml, con un MWCO (siglas del inglés *molecular weight cutoff*, límite de
30 peso molecular) de 7 K, según el protocolo del fabricante. La concentración de mAb se determinó midiendo el valor de

UA280 y se convirtió a mg/ml utilizando el coeficiente de extinción del mAb.

1.5.2 Desprotección de cisteínas

[00234] La purificación se realizó utilizando una
5 plataforma de purificación AKTA Xpress (GE Healthcare). Se
cargó hasta 1 l de medio condicionado en una columna
MabSelect de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada en fosfato de
sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0. La columna se lavó
extensamente con tampón de equilibrado después de la carga,
10 hasta que se observaron unos valores iniciales estables. El
material unido se eluyó utilizando glicina 100 mM, pH 2.9.
El material eluido se inyectó inmediatamente en una columna
de desalinización HiPrep 26/10 (GE Healthcare) equilibrada
en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X y se eluyó
15 en el mismo tampón. Las fracciones de los picos se agruparon.
Se analizó el material en cuanto al contenido de proteínas
mediante ensayo de BCA (ThermoFisher) y electroforesis
mediante SDS-PAGE reductora y no reductora.

20 1.6 Cribado inicial y caracterización de anticuerpos anti- mesotelina quiméricos recombinantes para el desarrollo de ADC

[00235] Los anticuerpos anti-mesotelina se expresaron
transitoriamente y se cultivó en 96 placas de pocillos
profundos utilizando medio Expi-293. Los anticuerpos del
25 sobrenadante se purificaron y descisteinilaron como se
describe anteriormente. Los anticuerpos se conjugaron
utilizando Mal-PEG₂-Auristatina F como carga útil utilizando
una relación molar de 1:5 (mAb:carga útil). Los anticuerpos
conjugados se desalinizaron para eliminar la carga útil libre
30 adicional utilizando placas de desalinización de
centrifugación Thermo Zeba.

1.7 Caracterización de la unión

1.7.1 Agrupamiento de epítomos anti-mesotelina utilizando Octet

[00236] El epítomo del anticuerpo de unión a la mesotelina se caracterizó inicialmente utilizando Octet, con punta de estreptavidina, utilizando un ensayo de unión personalizado. La unión al epítomo de los anticuerpos anti-mesotelina se normalizó con respecto al epítomo al que se une un anticuerpo anti-mesotelina conocido, MORAb-009 (Amatuximab). Los anticuerpos se agruparon en función de su unión al mismo, próximo o distinto epítomo que MORAb-009. Las etapas se repitieron hasta que todos los anticuerpos se alinearon con distintos agrupamientos de epítomos. La afinidad de unión se clasificó como alta, media y baja basándose en los resultados de Octet. Todas las etapas de unión se realizaron en el tampón PBST que contenía BSA al 0.2 %.

1.7.2 Análisis de unión por resonancia de plasmón superficial (BIAcore)

[00237] La afinidad de unión de los anticuerpos anti-mesotelina a la mesotelina se midió mediante BIAcore (BIAcore T-100, GE Healthcare, n.º 1426075), utilizando un chip CM5 de la serie S. Las concentraciones de los anticuerpos se ajustaron a 1 µg/ml y la mesotelina (50 µg) a 100 nM en tampón HBS-P+ 1X (GE Healthcare). El chip de captura anti-anticuerpos humanos se preparó de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando un chip CM5 con asistente de inmovilización. Los niveles finales de anticuerpos de captura fueron 8000-9000 UR, en HBS-P+. El chip se preparó para el ensayo con cinco ciclos de inyección de tampón de 300 segundos seguidos de una regeneración de 30 segundos,

todo a 30 µl/min en las cuatro celdas de flujo. Los anticuerpos se capturaron en las celdas de flujo 2-4 mediante inyecciones secuenciales de soluciones de ligandos individuales durante 90 segundos a 10 µl/min. La inyección del analito se realizó con una cinética de ciclo único, mediante inyecciones secuenciales de soluciones de analito de baja a alta concentración durante 240 segundos cada una a 30 µl/min. La detección fue 2-1, 3-1, 4-1. La doble referenciación se realizó mediante una secuencia de inyecciones de captura de ligando idénticas, seguida de 5 inyecciones de tampón solo durante 240 segundos cada una, disociación durante 1800 segundos y regeneración como se indicó anteriormente. Se analizó la unión a mesotelina de todos los ligandos por duplicado. El análisis cinético se realizó utilizando el programa informático BIAE Evaluations utilizando un modelo de ajuste de Langmuir 1:1. Se promediaron las constantes de asociación, la constante de disociación y de afinidad a partir de ejecuciones duplicadas.

1.8 Análisis de citotoxicidad *in vitro*

[00238] Las células A431, A431-K5 y OVCAR3 se subcultivaron y sembraron a 5,000 células/pocillo en medio de crecimiento completo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos, y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante una noche (16 horas). Los reactivos de prueba se diluyeron en serie 1:3 en placas de dilución de pocillos profundos de 2 ml, comenzando a 200 nM (10 diluciones en total). Se añadieron las muestras diluidas (100 µl) a las placas de células (concentración inicial de las muestras de prueba a 100 nM). Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 5 días adicionales. A continuación, se descartó el medio y las placas se lavaron una vez con 200 µl de DPBS, se tiñeron

con 50 µl de solución de cristal violeta al 0.2 % a temperatura ambiente durante 15 min y después se lavaron abundantemente con agua del grifo. Las placas se secaron al aire y se disolvió cristal violeta con 200 µl de solución de SDS al 1 %. Las placas se leyeron a 570 nm. Los datos se analizaron con GraphPad Prism 6.

1.9 Resultados

1.9.1 Inmunización de conejos

[00239] Se inmunizaron dos conejos con ADN con el plásmido pB8-mesotelina-humana con cuatro aplicaciones genéticas. Se tomaron sueros inmunes el día 52 del protocolo de inmunización, se diluyeron 1:1000 o 1:5000 en PBS que contenía BSA al 1 % y se probaron mediante citometría de flujo utilizando células que expresan mesotelina. Los sueros de ambos conejos inmunizados se unieron a las células que expresaban mesotelina, que eran células transfectadas con pB1-mesothelin-hu (FIG. 1, curvas de la parte inferior). Por el contrario, los sueros de los conejos inmunizados no se unieron a las células transfectadas con un ADNc irrelevante (FIG. 1, curvas de la parte superior).

1.9.2 Cribado de alto rendimiento de cultivos que producen anticuerpos policlonales de conejo contra la mesotelina humana

[00240] Se recogieron células de ganglio linfático de conejo y se criopreservaron. Se sembraron células (2×10^7 células) de ganglio linfático descongeladas a 5 células por pocillo en una placa de 384 pocillos con células alimentadoras y se cultivaron en IMDM completo que contenía citocinas IL-2 humana 10.5 ng/ml y IL-21 humana 10.5 ng/ml. Se identificaron los pocillos que producían anticuerpo IgG de conejo dos semanas después de la siembra, a través de

FRET para IgG utilizando criptato de europio, y se cribaron mediante ELISA 18,715 cultivos productores de IgG en cuanto a la reactividad con mesotelina humana. Ochenta y cinco cultivos específicos para mesotelina se reconfirmaron en
5 cuanto a la reactividad con la mesotelina y se contracribaron contra la reactividad con CD73 humano. Hubo 54 cultivos confirmados que producían anticuerpos Fcγ de conejo que se unían a la mesotelina por encima de 0.2 DO₄₅₀ sin reactividad cruzada con CD73 (FIG. 2). Los resultados de ELISA primarios
10 se muestran en el conjunto de barras más a la derecha, los resultados de ELISA secundarios se muestran en el conjunto de barras más a la izquierda y la unión a CD73 humano se muestra en el conjunto de barras intermedio.

1.9.3 RT-PCR, secuenciación y clonación de regiones 15 variables

[00241] Se aisló ARN total a partir de 54 cultivos confirmados que producían anticuerpos IgG anti-mesotelina de conejo, se sintetizó el ADNc mediante RT-PCR y las regiones variables de cadena ligera y pesada se amplificaron mediante
20 PCR. Se analizaron cincuenta y dos secuencias de ADN utilizando las familias de genes V y genes J de conejo (IMGT/V-QUEST) y 51 se amplificaron por PCR con cebadores específicos para la clonación In-Fusion en vectores de expresión de región constante (FIG. 3). Se clonó un total de
25 48 anticuerpos en vectores de expresión de región constante humana y posteriormente se transfectaron en células expi293F. Se detectó anticuerpo en 45 de los 51 transfectantes (FIG. 4), las regiones variables de conejo se clonaron por In-Fusion en vectores de expresión de región
30 constante humana.

1.9.4 Cribado inicial de los ADC frente a células que expresan mesotelina

[00242] Los anticuerpos quiméricos anti-mesotelina humana de conejo (anti-MSLN rb-hu-xi) se purificaron de acuerdo con el método descrito en la Sección 1.5. Se determinó la concentración de proteína de los anticuerpos purificados (FIG. 5). Para completar el cribado de anticuerpos anti-mesotelina para el desarrollo de ADC, se realizó microconjugación de anticuerpos anti-mesotelina con Mal-PEG₂ Auristatina F, y los ADC se caracterizaron en el ensayo de potencia basado en células *in vitro* utilizando las líneas celulares OVCAR3, A431-K5 y A431, en que OVCAR3 y A431-K5 expresaron un alto nivel de mesotelina y A431 (MSLN⁻) se utilizó como línea celular de control para evaluar la destrucción inespecífica y la especificidad de los ADC (FIG. 6).

1.9.5 Unión al epítipo de anticuerpos anti-mesotelina

[00243] El epítipo de unión a la mesotelina de los 48 anticuerpos anti-mesotelina se caracterizó utilizando Octet, como se indica en la Sección 1.7.1. Se identificaron seis epítopos distintos para los anticuerpos, no observándose unión alguna de 102A6 en el formato actual de Octet (FIG. 7). La afinidad de unión de los anticuerpos a la mesotelina se midió mediante BIAcore, como se indica en la Sección 1.7.2. Los resultados de afinidad de unión se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Afinidad de unión del anticuerpo anti-mesotelina a la mesotelina

	Agrupamiento de epítomos	Curva	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$R_{máx}$ (UR)	Chi^2 (UR ²)
5		M09-3	1.95E+06	2.92E-04	1.50E-10	40.19	0.646
		55B4-1	1.67E+06	8.32E-03	4.98E-09	42.33	1.72
10		55B4-2	1.04E+06	5.52E-03	5.33E-09	42.6	0.586
	MORAb-009	62B10-1	2.10E+06	8.57E-03	4.08E-09	47.6	3.54
		62B10-2	9.91E+05	6.71E-03	6.77E-09	46.58	0.398
15		131F9-1	8.36E+05	7.23E-03	8.65E-09	48.89	0.458
		131F9-2	8.71E+05	6.79E-03	7.79E-09	48.71	0.639
20		145D4-1	8.05E+05	6.83E-03	8.48E-09	50.61	0.489
		145D4-2	8.69E+05	6.90E-03	7.95E-09	51.21	0.681
25		342P20-1	1.74E+06	2.27E-04	1.30E-10	29.15	0.498
		342P20-2	2.32E+06	2.51E-04	1.08E-10	27.51	0.447
		Xi-33O11	1.99E+06	6.68E-04	3.35E-10	35.89	0.169
30		43F8-1	7.10E+05	6.37E-03	8.97E-09	35.29	0.48

5	n.° 1	43F8-2	7.77E+05	5.82E-03	7.48E-09	36.43	0.78
		201C15-1	2.74E+05	1.29E-04	4.70E-10	63.95	0.75
		201C15-2	2.64E+06	3.45E-04	1.31E-10	58.09	0.568
		X-237N18	1.27E+06	4.28E-03	3.38E-09	41.45	0.295
		Xi-393L14	1.10E+06	2.57E-04	2.33E-10	46.47	0.627
10	n.° 3	Xi-383I18 (AuF)	1.01E+06	2.81E-04	2.80E-10	43.9	0.494
15		346C6-1	6.82E+05	4.81E-04	7.06E-10	44.85	0.218
		346C6-2	1.15E+06	6.09E-04	5.29E-10	45.06	0.503
		345A12-1	2.89E+06	4.12E-04	1.43E-10	39	0.793
20	n.° 5	345A12-2	2.85E+06	3.89E-04	1.36E-10	38.63	0.833
25		120N18-1	6.26E+05	5.26E-04	8.41E-10	50.28	0.323
		120N18-2	6.57E+05	5.13E-04	7.80E-10	50.89	0.395
		82M2-1	7.18E+05	4.35E-04	6.06E-10	47.12	0.493
30	n.° 6	82M2-2	8.98E+05	4.74E-04	5.28E-10	48.64	0.961
	M09/n.° 2	264E24-1	4.01E+05	5.81E-05	1.45E-10	48.8	0.347

híbrido	264E24-2	4.10E+05	5.47E-05	1.34E-10	49.33	0.423
M09/n.º 3	238B22-1	2.60E+05	3.03E-03	1.17E-08	153.1	6.95
híbrido	238B22-2	4.31E+05	6.03E-03	1.40E-08	57.04	0.318

5 [00244] Basándose en los resultados anteriores, se seleccionaron quince anticuerpos que cubren todos los agrupamientos de epítomos para la conjugación y

10 caracterización de cambio de escala, como se indica en la Tabla 16. También se seleccionó 102A6A basándose en su favorable potencia *in vitro* cuando se conjuga con auristatina F.

15 **Tabla 16. Quince anticuerpos anti-mesotelina seleccionados y sus agrupamientos de epítomos**

Agrupamiento de epítomos	Anticuerpos principales
Agrupamiento n.º 1	33011, 210C15
20 Agrupamiento n.º 2	111B10, 32405, 178F16, 264E24
Agrupamiento n.º 3	237N18, 383I18, 393L14, 346C6
25 Agrupamiento n.º 4	62B10, 55B4, MORAb009
Agrupamiento n.º 5	120N18, 345A12
Sin unión	102A6A

30 EJEMPLO 2: Humanización de los ADC anti-mesotelina

[00245] Se generaron anticuerpos anti-mesotelina humanizados de acuerdo con los procedimientos descritos a

continuación. Se analizaron los anticuerpos y los ADC para determinar la actividad de unión conservada para la mesotelina humana y la potencia de destrucción de células hacia las células que expresan mesotelina. Los anticuerpos también se caracterizaron desde el punto de vista biofísico en cuanto a carga de fármaco, agregación, estabilidad térmica y estabilidad en suero y en matriz. Los anticuerpos humanizados principales y los ADC se evaluaron *in vivo*, como se describe en el Ejemplo 3.

10 1

2.1 Reactivos y materiales

2.1.1 Anticuerpos

[00246] Los anticuerpos utilizados en los siguientes estudios tienen una cisteína desapareada en la posición 80 de la cadena ligera (LCcys80) e incluyen tanto la forma quimérica de conejo-humano (-xi) como la forma humanizada (-zu) de los anticuerpos anti-mesotelina humana 33011, 201C15, 111B10, 32405, 178F16, 264E24, 237N18, 383I18, 393L14, 346C6, 62B10, 55B4, MORAb009, 120N18, 345A12 y 102A6A2. Los anticuerpos se purificaron por lotes utilizando una resina Prosep-vA High Capacity Protein A y columnas de desalinización Zeba. El medio condicionado se purificó y descisteiniló como se describe en la Sección 1.5 (Ejemplo 1). El contenido de proteínas final se evaluó a través de un ensayo de BCA y SDS-PAGE.

25

2.1.2 Citotoxinas conjugables y ADC con LCcys80

[00247] Los compuestos de enlazador-citotoxina utilizados en los siguientes estudios incluyen maleimida-VCP-eribulina, maleimida-VCP-criptoficina y maleimida-VCP-dímero de eribulina. Los anticuerpos conjugados se purificaron mediante cromatografía de desalinización con

30

columnas de desalinización HiTrap (GE Healthcare) equilibradas en DPBS 1X. El contenido de proteínas final se determinó mediante ensayo de BCA.

2.1.3 Líneas celulares tumorales

5 [00248] Las líneas de células tumorales humanas utilizadas en los análisis de los ADC quiméricos de conejo-humano incluyeron A431 (células de melanoma humano, MSLN^{neg}), A3 (A431 transfectadas de forma estable con mesotelina humana, MSLN^{alta}) OVCAR3 (células de carcinoma de ovario humano, MSLN^{alta}), HEC-251 (endometrioides humanas, MSLN^{med}) y 10 H226 (mesotelioma de células escamosas de pulmón humano, MSLN^{baja}). Todas las líneas celulares utilizadas se obtuvieron directamente de la American Type Culture Collection (ATCC), con la excepción de A3, que se generó en Morphotek a partir 15 de la línea celular parental A431 y HEC-251, que se obtuvo de JCRB.

2.1.4 Otros reactivos

 [00249] Todos los reactivos utilizados se obtuvieron de proveedores comerciales de calidad de investigación o 20 superior, a menos que se indique lo contrario.

2.2 Caracterización biofísica de los ADC

2.2.1 Análisis de agregación por SEC-HPLC

 [00250] El análisis por SEC-HPLC se realizó utilizando el sistema de HPLC Agilent 1200. Se conectó una 25 precolumna AdvanceBio SEC 300A (2.7 µm, 7.8 x 50 mm, n.º de serie 0006344424-13, n.º de lote 0006344424) a la columna analítica AdvanceBio SEC 300A (2.7 µm, 7.8 x 300 mm, n.º de serie 0006336837-4, n.º de lote 0006336837), equilibrada en fosfato de sodio 0.1 M, cloruro de sodio 0.15 M, IPA al 5 %, 30 pH 7.4, con un caudal de 0.5 ml/min.

[00251] La agregación de los ADC LCcys80 se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de, exclusión por tamaño (SEC-HPLC) utilizando un HPLC Agilent 1200. Se prepararon los anticuerpos y los ADC a 2 mg/ml en DPBS 1X, se inyectaron 8 µl (16 µg) de cada muestra y se ejecutaron durante 36 min. Todos los datos se analizaron con el programa informático Agilent ChemStation. Se informó el porcentaje de agregación, el porcentaje de monómero y el porcentaje de fragmentación.

10 **2.2.2 Análisis de la DAR por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC-HPLC)**

[00252] La DAR se analizó utilizando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC-HPLC) en un sistema Agilent HPLC 1260. Las muestras se inyectaron en una columna TSKgel Etil-5PW (TOSOH Bioscience, 7.5 mm DI x 7.5 cm, 10 µm, formato no poroso) y se eluyeron de la columna con un equilibrado de 3 min en 100 % de fase móvil A, un gradiente de 15 min (B al 0-100 %), una retención de 5 min en B al 100 %, un cambio de 1 min a A al 100 % y un reequilibrado de 5 min en 100 % de fase móvil A, a 0.7 ml/min. La fase móvil A era fosfato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 1.5 M, pH 7.0. La fase móvil B era fosfato de sodio 25 mM, isopropanol al 25 %, pH 7.0. La detección se realizó a 280 nm (referencia 320 nm). La DAR se determinó mediante la fórmula:

25
$$[ABC+1 + 2(ABC+2) + 3(ABC+3) + \dots n(ABC+n)] / \Sigma ABC_{tot}$$

en que ABC+1 es el área bajo la curva para el pico del anticuerpo correspondiente al ADC conjugado con una citotoxina, y ABC+2 es el área bajo la curva para el pico del anticuerpo correspondiente al ADC conjugado con dos citotoxinas. ΣABC_{tot} es el área bajo la curva combinada de los picos conjugados y no conjugados (DAR = 0, 1 y 2).

30

2.2.3 Análisis de la DAR por cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS)

[00253] La DAR también se analizó utilizando un método de LC-MS con un HPLC de Waters Alliance con detección
5 SQD/PDA. Las muestras se inyectaron en una columna Proteomix RP-1000 (5 μ m, 1000 Å, 4.6 mm x 15 cm, Sepax) a 65 °C y se eluyeron con un equilibrado de 3 min en B al 25 %, un gradiente lineal de 27 min de B desde el 25 %-55 %, una retención de 5 min en B al 55 %, un cambio de 1 min a B al
10 90 %, una retención de 5 min a B al 90 %, un cambio de 1 min nuevamente a B al 25 % y un reequilibrado de 5 min en B al 25 %. La fase móvil A era TFA al 0.1 % en agua y la fase móvil B era TFA al 0.1 % en acetonitrilo. A continuación, el producto eluido se dividió 10:1 en detectores PDA y SQD. El
15 detector SQD se configuró como positivo para ES, voltaje capilar a 3.5 KV, voltaje de cono a 50 V, extractor a 5 V y lente RF a 0.3 V, temperatura de fuente a 150 °C, temperatura de desolvatación a 350 °C. Los datos de masas se adquirieron a 200-2000 m/z durante 40 min, modo continuo y tiempo de
20 exploración de 1 segundo. Los datos se analizaron y desconvolucionaron fuera de línea utilizando MassLynx y MaxEnt1. La DAR se calculó mediante la fórmula:

$$2 \left[\frac{ABCLC+1 + 2(ABCLC+2) + 3(ABCLC+3) + \dots + n(ABCLC+n)}{\Sigma ILC_{tot}} \right] + 2 \left[\frac{ABCHC+1 + 2(ABCHC+2) + 3(ABCHC+3) + \dots + n(ABCHC+n)}{\Sigma ABCHC_{tot}} \right]$$

25

en que ABCLC+1 es el área bajo la curva del pico de la cadena ligera conjugada con una citotoxina, ABCLC+2 es el área bajo la curva del pico de la cadena ligera conjugada con dos citotoxinas, etc. ABCHC son el área bajo la curva de
30 las correspondientes cadenas pesadas, y $\Sigma ABCLC_{tot}$ y $\Sigma ABCHC_{tot}$ son el área combinada bajo la curva de todas las

cadenas ligeras y cadenas pesadas no conjugadas y conjugadas, respectivamente.

2.3 Caracterización de la unión

2.3.1 Agrupamiento de epítomos anti-mesotelina

5 **utilizando Octet**

[00254] El epítomo del anticuerpo de unión a la mesotelina se caracterizó inicialmente utilizando Octet, con punta de estreptavidina, utilizando un ensayo de unión personalizado. La unión al epítomo de los anticuerpos anti-
10 mesotelina se normalizó con respecto al epítomo al que se une un anticuerpo anti-mesotelina conocido, MORAb-009. Los anticuerpos se agruparon en función de su unión al mismo, próximo o distinto epítomo que MORAb-009. Las etapas se repitieron hasta que todos los anticuerpos se alinearon con
15 distintos agrupamientos de epítomos. La afinidad de unión se clasificó como alta, media y baja basándose en los resultados de octet. Todas las etapas de unión se realizaron en el tampón PBST que contenía BSA al 0.2 %.

2.3.2 Análisis de unión por resonancia de plasmón
20 **superficial (BIAcore)**

[00255] La afinidad de unión de los anticuerpos anti-mesotelina a la mesotelina se midió mediante BIAcore (BIAcore T-100, GE Healthcare, n.º 1426075), utilizando un chip CM5 de la serie S. Las concentraciones de los anticuerpos se
25 ajustaron a 1 µg/ml y la mesotelina (50 µg) a 100 nM en tampón HBS-P+ 1X (GE Healthcare). El chip de captura anti-anticuerpos humanos se preparó de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando un chip CM5 con asistente de inmovilización. Los niveles finales de anticuerpos de
30 captura fueron 8000-9000 UR, en HBS-P+. El chip se preparó para el ensayo con cinco ciclos de inyección de tampón de

300 segundos seguidos de una regeneración de 30 segundos, todo a 30 µl/min en las cuatro celdas de flujo. Los anticuerpos se capturaron en las celdas de flujo 2-4 mediante inyecciones secuenciales de soluciones de ligandos individuales durante 90 segundos a 10 µl/min. La inyección del analito se realizó con una cinética de ciclo único mediante inyecciones secuenciales de soluciones de analito de baja a alta concentración durante 240 segundos cada una a 30 µl/min. La detección fue 2-1, 3-1, 4-1. La doble referenciación se realizó mediante una secuencia de inyecciones de captura de ligando idénticas, seguida de 5 inyecciones de tampón solo durante 240 segundos cada una, disociación durante 1800 segundos y regeneración como se indicó anteriormente. Se analizó la unión a mesotelina de todos los ligandos por duplicado. El análisis cinético se realizó utilizando el programa informático BIAE Evaluations utilizando un modelo de ajuste de Langmuir 1:1. Se promediaron las constantes de asociación, la constante de disociación y de afinidad a partir de ejecuciones duplicadas.

2.4 Análisis de estabilidad térmica por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

[00256] Se utilizó el calorímetro diferencial de barrido capilar VP (VP-CapDSC; Microcal, VP-CapDSC, n.º 12-07-149 con representación gráfica de Origin-7 y programa informático MicroCal VP-Capillary DSC v.2.0) para descifrar y comparar la estructura de orden superior y la estabilidad térmica de diversos fragmentos F(ab')₂ y controles. Las muestras se prepararon en placas de ensayo de 96 pocillos (Microliter Analytical Supply) utilizando una solución de Contrad al 20 % y se analizaron en un muestreador automático a 10 °C.

2.5 Análisis de isoelectroenfoque capilar (cIEF)

[00257] Los reactivos del muestreador automático se llenaron de acuerdo con los procedimientos de instalación y puesta en marcha del CFR. Se utilizó hemoglobina como patrón de estabilidad del sistema. Se utilizó la configuración predeterminada para el análisis de datos por lotes. El período de enfoque n.º 1 se realizó durante 1 min a 1,500 V tanto para los patrones de adecuación del sistema como para las muestras. El período de enfoque n.º 2 se realizó durante 5 min a 3,000 V para los patrones de adecuación del sistema y 11 min a 3,000 V para las muestras de TIGC y los controles de tampón coincidentes. Las muestras de TIGC duplicadas utilizaron el período de enfoque n.º 2 a los 4.5 min y todas las muestras se pusieron con un patrón de idoneidad del sistema. Las muestras se integraron automáticamente utilizando un parámetro de ancho de pico de 0.1 y un umbral de 5, y se integraron entre pI 7.5 - 9.4.

2.6 Preparación de los ADC MORAb-109 de DAR2 y DAR6

[00258] La línea celular 345A12-HC15-LC4 CHOZN se cultivó en una bolsa ondulada (20 l) hasta una viabilidad < 30 % y se concentró a 2 l utilizando FFT. El anticuerpo se capturó en resina Amosphere A3 preequilibrada en fosfato de sodio 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7.2, se lavó en el mismo tampón hasta que se alcanzaron unos valores iniciales estables (para eliminar el material no unido), después se redujo en la columna durante 8 horas utilizando fosfato de sodio 20 mM, EDTA 10 mM, cisteína 10 mM, pH 7.2 a bajo caudal y después se reoxidó en la columna durante 60 horas utilizando Tris 20 mM, pH 7.5. El material unido se eluyó en glicina 0.1 M, pH 3.0, se diafiltró después en PBS 1X, EDTA 2 mM, pH 7.4 y

se concentró hasta > 10 mg/ml. La recuperación final fue del 100 %.

[00259] Para MORAb-109 de DAR2, se añadió maleimida-VCP-eribulina (en DMSO) en una relación molar de 1:2.5 (mAb:carga útil) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la conjugación, el material se diluyó a 2 mg/ml, se diafiltró en PBS 1X, EDTA 2 mM para eliminar el enlazador-carga útil no conjugados y se concentró a 5 mg/ml. El material de DAR2 se purificó mediante cromatografía preparativa Eter-5PW HIC. El material final se caracterizó por SEC-HPLC, RP-HPLC y HIC-HPLC.

[00260] Para MORAb-109 de DAR6, el anticuerpo purificado/descisteinilado se diluyó a 7.5 mg/ml en PBS 1X, EDTA 2 mM y se redujo adicionalmente añadiendo un volumen igual de TCEP 250 µM en el mismo tampón durante 50 min, después se añadió un volumen total igual de propilenglicol al 50 % en DPBS 1X/EDTA 1 mM y, finalmente, maleimida-VCP-eribulina en una relación molar de 1:8 (mAb:carga útil), se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. El ADC se purificó mediante cromatografía G-25 para eliminar la carga útil no conjugada y se formuló en PBS 1X, EDTA 2 mM. El material final se caracterizó por SEC-HPLC, RP-HPLC y HIC-HPLC.

2.7 Estabilidad en suero *in vitro*

[00261] Se prepararon los ADC anti-mesotelina (maleimida-VCP-eribulina como carga útil) a 0.5 mg/ml en PBS o suero humano. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 0, 24, 48, 72, 96 o 240 horas y después se transfirieron a -80 °C para su almacenamiento. Todas las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se hizo una única dilución de 1:2000 para la prueba. Las muestras se probaron

en cuanto a mAb total, ADC total y la potencia basada en células. El ensayo de mAb total se desarrolló como un formato de sándwich escalonado en Gyrolab XP, se capturó con mesotelina biotinilada y se detectó con anti-Fc de IgG1 Alexa Fluor 647. Los intervalos cuantificables para los ensayos de mAb total y ADC intacto fueron 6.25-800 ng/ml y 6.25-800 ng/ml, respectivamente. La curva patrón y los controles de calidad se realizaron con MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina).

2.8 Estabilidad en matriz sensible a la DAR *in vitro* de los ADC MORAb-109

[00262] MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina) de DAR 2 se preparó a 0.1 mg/ml en PBS o suero humano, de mono, de rata o de ratón por triplicado. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 0, 24, 48, 72, 96 o 240 horas. Las muestras extraídas de cada punto de tiempo se transfirieron a -80 °C para su almacenamiento. El análisis se realizó utilizando un ensayo de interferometría de biocapa sin marcadores. Las muestras de matriz se diluyeron a 1:20 en PBS 1X que contenía Tween-20 al 0.05 % y BSA al 1 % (tampón de ensayo). Las muestras de control de MORAb-109 de DAR 0, DAR 1, DAR 2 y DAR 6 se diluyeron a 0.1 mg/ml en una matriz coincidente. Las muestras de control negativo eran solo matriz al 5 %. La mesotelina biotinilada a 5 µg/ml en tampón de ensayo se capturó en puntas biosensoras de estreptavidina EA (300 s; Pall-ForteBio), seguida de la captura de muestras de estabilidad diluidas y controles (300 s). A continuación, se cuantificó la carga útil mediante la unión del anticuerpo anti-eribulina 5E4 quimérico humano-conejo a 100 mg/ml. La asociación se controló durante 300 segundos, momento en el que la unión había alcanzado el equilibrio. El nivel de unión

al final de la fase de disociación (R_{eq}) se determinó para cada muestra a los 295 s de asociación. La estabilidad se determinó representando gráficamente el R_{eq} porcentual con respecto a t_0 , en que:

5 R_{eq} porcentual = $R_{eq}t_x/R_{eq}t_0$ [100] y t_x = 0 - 240 horas.

2.9 Análisis de citotoxicidad *in vitro*

[00263] Las células A431, A3, OVCAR3, HEC-251 y H226 se subcultivaron y sembraron a 5,000 células/pocillo en medio de crecimiento completo en placas de cultivo de tejidos de 10 96 pocillos, y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante una noche (16 horas). Los reactivos de prueba se diluyeron en serie 1:3 en placas de dilución de pocillos profundos de 2 ml, comenzando a 200 nM (10 diluciones en total). Se añadieron las muestras diluidas (100 µl) a las placas de 15 células (concentración inicial de las muestras de prueba a 100 nM). Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 5 días adicionales. A continuación, se descartó el medio y las placas se lavaron una vez con 200 µl de DPBS, se tiñeron con 50 µl de solución de cristal violeta al 0.2 % a 20 temperatura ambiente durante 15 min y después se lavaron abundantemente con agua del grifo. Las placas se secaron al aire y se disolvió cristal violeta con 200 µl de solución de SDS al 1 %. Las placas se leyeron a 570 nm. Los datos se analizaron con GraphPad Prism 6.

25 2.10 Resultados

2.10.1 Cribado inicial de los ADC de eribulina anti-mesotelina humanizados

[00264] Se subclonaron quince anticuerpos anti-mesotelina, se expresaron y purificaron con cambio de escala, 30 y se conjugaron utilizando maleimida-VCP-eribulina como carga útil en la posición Cys80. Todos los ADC se purificaron

y caracterizaron utilizando SEC-HPLC para un análisis de agregación, HIC-HPLC para el análisis de la DAR y un ensayo basado en células con las líneas celulares A431-A3 (MSLN^{alta}), A431 (MSLN^{baja}), y OVCAR3 (MSLN^{alta}). Las células se trataron con ADC durante 6 horas y después se lavaron o se trataron durante 48 horas (células A431-A3 y A431) o 72 horas (células OVCAR3) para la comparación de potencias. Los datos de caracterización se resumen en la Tabla 17. Basándose en los siguientes datos caracterización, se seleccionaron seis anticuerpos (en negrita) para la humanización.

15

20

25

30

Tabla 17. Caracterización de quince ADC de eribulina anti-mesotelina

5

10

15

20

25

30

N.º	Nombre de la muestra	Conc. (mg/ml)	Lot	DA	SEC-HPLC	% mAb monomérico	SEC-HPLC	% ADC monomérico	A3-6 horas	Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
										A3-48 horas	A431-6 horas	A431-48 horas	OVCA-R3-6 horas	OVCA-R3-72 horas
1	33011-VCP-Eribulina	0.46	02750-83G	2.00		95.4		97.58	0.90	0.50	>100	>100	2.74	4.59
2	111B10-VCP-Eribulina	0.98	02750-83H	2.00		89.9		93.69	0.30	0.14	>100	>100	3.11	3.15
3	32405-VCP-Eribulina	0.97	02750-83I	2.00		83.5		85.92	1.15	0.72	>100	>100	3.33	2.40
4	178F16-VCP-Eribulina	0.99	02750-83J	2.00		81.4		84.54	0.65	0.38	>100	>100	1.36	0.08
5	237N18-VCP-	0.83	02750-83K	2.00		92.8		95.84	0.51	0.24	>100	>100	14.65	4.41

5	13	264E24 -VCP- Eribul ina	0.6 6	027 50- 83J	1. 63	46.2?	73.67	1.04	4	0.7 4	>10 0	>100	1.71	0.14
	14	345A12 -VCP- Eribul ina	0.4	027 50- 83K	2. 00	95.7	98.53	0.95	0	0.8 0	>10 0	>100	0.66	0.09
	15	102A6A -VCP- Eribul ina	0.1 9	027 50- 83D	2. 00	98.1	67.87	0.38	1	0.2 0	>10 0	>100	1.92	0.12
	16	102A6B -VCP- Eribul ina	0.3 1	027 50- 83L	2. 00	97.9	19.02	0.84	3	0.5 0	>10 0	>100	1.85	0.14
	17	1552- VCP- Eribul ina	0.6 3	027 50- 83F	1. 89	97.1	97.20	>100	78	58. 0	>10 0	>100	>100	10.60
	18	Eribul ina	6mM					4.08	9	1.0 6	2.8 0.00		2.81	0.25

2.10.2 Humanización de HCl-LCl y citotoxicidad *in vitro* de los ADC

25 [00265] Las secuencias de las regiones Fv de 102A6A2, 11B10, 201C15, 345A12 y 346C6 de conejo se sometieron a BLAST en cuanto a la homología más cercana a las secuencias de proteínas de dominio variable de la estirpe germinal humana utilizando herramientas del IGBLAST (National Center for

30 Biotechnology Information (NCBI)) y de IMGT/DomainGapAlign (International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®))

herramientas. Las secuencias marco conservadas de conejo se
sustituyeron por las secuencias de estirpe germinal humana
homólogas más cercanas para generar variantes humanizadas
injertadas con CDR (HC1 y LC1). Los dos restos finales de
5 FWRH2 definido por Kabat se mantuvieron como restos de
conejo. El resto final de FWRH3 definido por Kabat se
conservó para 111B10. El motivo de RESPECT-L Cys80 y Ala83
en la región Vk se mantuvo en todos los clones. Después de
generar los anticuerpos humanizados, los anticuerpos
10 quiméricos y humanizados se conjugaron con tres cargas útiles
distintas (maleimida-VCP-eribulina, maleimida-VCP-
criptoficina y maleimida-VCP-dímero de eribulina) variando
la hidrofobicidad. La afinidad de unión a la mesotelina se
midió mediante BIAcore para todos los anticuerpos, y los ADC
15 se caracterizaron por el porcentaje (%) de agregación, la
DAR y la potencia *in vitro*, como se resume en la Tabla 18.
Además, se midieron las cargas útiles de potencia de los ADC
anti-mesotelina humanizados, y se resumen en la Tabla 19.
Los ADC tenían valores de CE50 de destrucción celular
20 nanomolares bajos en las cinco líneas celulares probadas.

25

30

Tabla 18. Sumario de caracterización de los ADC anti-mesotelina humanizados y quiméricos principales

		mAb parental				ADC								
		Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
			k _a (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ s ⁻¹)	K _D (10 ⁻⁹ M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
33011	xi	1				VCP-eribulina	1.92	8.97	91.03	40.67	0.008	3.950	>100	0.14
						VCP-criptoficina	1.87	12.74	87.26	6.79	0.010	0.110	0.06	0.03

		mAb parental			ADC								
Agrupamiento de epítopos		Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
		k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
5					VCP-dímero de eribulina	1.17	32.70	67.30	1.40	0.030	0.33	0.93	0.05
					VCP-eribulina	1.69	1.42	98.58	~100	0.064	26.50 0	>100	0.28
	zu	2.2	0.65	3.4	VCP-criptoficina	1.33	0.90	99.10	22.50	0.066	5.35	5.81	0.04

		mAb parental				ADC								
		Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
			k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)			Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OV3	HEC-251
						VCP-dímero de eribulina	1.63	1.08	98.92	2.01	0.025	0.31	0.22	0.04
111B10	xi	2	6.5	3.9	6.3	VCP-eribulina	1.90	4.25	95.75	38.10	0.004	13.960	~100	0.05
						VCP-criptoficina	1.86	8.83	91.17	10.93	0.011	1.600	2.66	0.016

		mAb parental			ADC								
5	Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
		k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
10					VCP-dímero de eribulina	1.85	9.25	90.75	0.96	0.007	0.06	0.71	0.011
					VCP-eribulina	1.81	3.64	96.36	68.92	0.014	27.42	>100	0.12
					VCP-criptoficina	1.76	1.80	98.20	4.30	0.011	0.820	1.36	0.015
15	zu	5.1	3	6.5									

		mAb parental				ADC								
		Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
			k _a (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ s ⁻¹)	K _D (10 ⁻⁹ M)			Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OV3	HEC-251
						VCP-dímero de eribulina	1.78	4.47	95.53	1.68	0.007	0.13	1.15	0.025
201C15	xi	1	2.4	0.26	1.1	VCP-eribulina	1.85	1.62	98.38	48.50	0.004	14.82	~100	0.27
						VCP-criptoficina	1.75	2.10	97.90	8.08	0.012	0.540	1.02	0.12

		mAb parental			ADC								
5	Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
		k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
10					VCP-dímero de eribulina	0.96	0.00	100.00	0.63	<0.003	0.10	0.64	0.065
	zu	3.1	1.1	4.2	VCP-eribulina	1.80	5.84	94.16	68.88	0.290	20.42	>100	0.41
					VCP-criptoficina	1.74	11.51	88.49	2.55	0.120	0.600	1.73	0.037

		mAb parental				ADC								
		Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
										k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR
						VCP-dímero de eribulina	1.75	9.94	90.06	1.12	0.063	0.28	1.26	0.082
346C6	xi	3	3.8	0.49	1.4	VCP-eribulina	1.56	5.28	94.72	34.49	0.087	5.73	~100	0.11
						VCP-criptoficina	1.52	8.28	91.72	4.18	0.042	0.190	1.21	0.043

		mAb parental			ADC								
Agrupamiento de epítopos		Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
		k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
5					VCP-dímero de eribulina	1.60	10.43	89.57	1.32	0.026	0.09	0.99	0.035
					VCP-eribulina	1.63	4.48	95.52	72.86	1.180	32.54	>100	0.55
					VCP-criptoficina	1.65	13.70	86.30	2.30	0.380	0.800	2.21	0.13
10													
15	zu	133	93	8.9									

		mAb parental				ADC								
Agrupamiento de epítopos			Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
			k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
						VCP-dímero de eribulina	1.68	4.86	95.14	1.36	0.140	0.34	1.86	0.13
						VCP-eribulina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
						VCP-criptoficina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

		mAb parental			ADC								
5	Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
		k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
10					VCP-dímero de eribulina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
					VCP-eribulina	1.72	4.24	95.76	63.49	0.004	20.70	>100	0.091
	zu	35	2.1	0.2	VCP-criptoficina	1.60	6.17	93.83	3.03	<0.003	0.350	0.69	0.01

		mAb parental				ADC								
		Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
			k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
						VCP-dímero de eribulina	1.59	5.05	94.95	1.04	<0.003	0.06	0.79	0.016
102A6A2	xi	7	s.u.	s.u	s.u	VCP-eribulina	nd	89.50	10.50	36.18	0.024	2	>100	0.12
						VCP-criptoficina	nd	100.00	0.00	9.52	0.110	0.280	0.21	0.11

		mAb parental				ADC								
		Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
			k _a (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ s ⁻¹)	K _D (10 ⁻⁹ M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
						VCP-dímero de eribulina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	zu		s.u.	s.u.	s.u.	VCP-eribulina	1.87	3.60	96.40	57.44	0.046	8.67	>100	3.02
						VCP-criptoficina	1.87	3.64	96.36	3.54	0.021	0.054	0.08	0.0092

		mAb parental				ADC								
		Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
			k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)			Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251
						VCP-dímero de eribulina	1.68	1.74	98.26	1.40	0.047	0.05	0.50	0.018
155D5	xi					VCP-dímero de eribulina	1.62	14.42	81.63	1.20	0.210	0.47	1.50	1.41
						Eribulina	nd	nd	nd	0.47	0.11	0.2	5.3	1.03
						Criptoficina	nd	nd	nd	0.8	0.24	0.43	1.94	1.01

mAb parental				ADC								
Agrupamiento de epítopos	Afinidad			Carga útil	HIC-Etilo	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, CE50 (nM)				
	k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% agregado	% de monómero	A431	OVCAR 3	HEC-251	H226	A3
				VCP-dímero de eribulina DiOH	nd	nd	nd	0.03	<0.003	0.003	0.32	0.08

Tabla 19. Potencia de cargas útiles *in vitro* basada en células

	CE50 (nM) de ensayo de citotoxicidad basado en células				
	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
Eribulina	0.47	0.11	0.2	5.3	1.03
Criptoficina	0.8	0.24	0.43	1.94	1.01
VCP-dímero de eribulina DiOH	0.03	<0.003	0.003	0.32	0.08

2.10.3 Perfeccionamiento de la humanización

[00266] Debido a la pérdida de la unión a la mesotelina para los clones 201C15, 345A12 y 346C6, se precisaron mutaciones posteriores para conservar la unión a la mesotelina. Las secuencias de Fv injertado con CDR y de conejo se utilizaron para generar modelos informáticos de los dominios variables. Se superpusieron la estructura teórica de los modelos de conejo y humanizado, y se analizaron los restos muy próximos a las CDR en cuanto a la posible influencia estructural sobre la estructura global de los bucles de CDR. Se identificaron los restos que diferían entre las secuencias de conejo y humanizadas. La mayoría de los restos que diferían no estaban ubicados en la interfaz del dímero o estaban distales con respecto a las CDR. Se descubrió que varios restos en las regiones VH y Vk estaban muy cerca (dentro de 5 Å) de las CDR y se analizaron adicionalmente.

[00267] Se identificaron dos regiones humanizadas en la región VH como que interferían posiblemente con la unión al antígeno en los clones 201C15, 345A12 y 346C6. El extremo N para todos los clones era un aminoácido más largo en HC1

que en la secuencia de conejo. Además, cada uno tenía una delección de 2 aminoácidos en FWRH3 (restos 72-73). Para cada uno de estos clones, los primeros cinco aminoácidos y los seis aminoácidos que rodean la delección de FWRH3 (restos 71-5 76) de HC1 se revirtieron a las secuencias de conejo. El resto 93 de 345A12 también se revirtió a conejo en HC5. Con respecto a LC1, los extremos N de 201C15, 345A12 y 346C6 se revirtieron a la secuencia de conejo. Se identificó que un resto en FWRL3 de 201C5 (resto 67) y 345A12 (resto 70) 10 interactuaba posiblemente con las CDR y se identificó igualmente un resto en FWRL2 de 346C6 (resto 36).

2.10.4 Sobrehumanización de 345A12

[00268] Con la identificación de restos de conejo adicionales en Vk como críticos para la unión al antígeno, 15 se generaron mutantes adicionales de 345A12 para introducir cantidades crecientes de restos humanos en las regiones VH y Vk. El análisis del modelo informático identificó los restos 35, 48, 49, 57, 58, 61, 62, 63 y 64 en VH y los restos 1, 3, 24, 55 y 70 en Vk.

2.10.5 Caracterización biofísica de anticuerpos 345A12 superhumanizados

[00269] Los anticuerpos 345A12 superhumanizados se purificaron a partir de 350 ml de cultivo celular de cambio de escala y se formularon en DPBS 1X. Los anticuerpos se 25 concentraron para la evaluación de las propiedades fisicoquímicas. Como se muestra en la Tabla 20, la combinación de HC10-LC7 y HC15-LC7 se precipitó durante la etapa de concentración, posiblemente debido a un pI relativamente bajo o a una mala solubilidad. Los anticuerpos 30 purificados se analizaron mediante BIAcore en cuanto a la

afinidad de unión a la mesotelina, y los datos se resumen a continuación en la Tabla 21.

Tabla 20. Sumario de anticuerpos 345A12 humanizados purificados

5	mAbs	Sobrenadante Volumen (ml)	Rendimiento de purificación	mAb-VCP-dímero de eribulina a DiOH, rendimiento	mAb-VCP-eribulina, rendimiento	Concentración a 5 mg/ml
10						
15	345A12-HC10-LC4	350 ml	77.5 mg a 5.1 mg/ml	3.9 mg a 1.3 mg/ml, 78 %	11 mg a 5.0 mg/ml, 73 %	Sí
20	345A12-HC10-LC7	350 ml	78 mg a 5.2 mg/ml	4.5 mg a 1.6 mg/ml, 90 %	8.1 mg a 2.7 mg/ml, 54 %	No, precipitado
25	345A12-HC15-LC4	350 ml	191 mg a 8.3 mg/ml	4.2 mg a 1.4 mg/ml, 84 %	11 mg a 4.85 mg/ml, 73 %	Sí
30	345A12-HC15-LC7	350 ml	87.2 mg a 4.0 mg/ml	3.3 mg a 1.1 mg/ml, 66 %	4.6 mg a 1.54 mg/ml, 73 %	No, precipitado

				g/ml, 31 %	
--	--	--	--	---------------	--

5

10

15

20

25

30

Tabla 21. Afinidad de unión a la mesotelina para 345A12 humanizado

	Agregación	Conjugación	Afinidad											
			Ejecución 1			Ejecución 2			Ejecución 3			Ejecución 4		
	% de Monómero	% de Conjugación	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
Quimérico			2.63E+06	4.64E-04	1.76E-10									
HC1-LC2	88.85	1.6	2.59E+06	4.32E-04	1.67E-10	2.47E+06	3.04E-04	1.13E-10						
HC1-LC4	82.96	1.33				2.35E+06	2.57E-04	1.18E-10	1.96E+06	1.30E-04	6.61E-11	1.35E+06	1.61E-04	1.19E-10
HC1-LC7	87.23	1.29							1.83E+06	1.40E-04	7.66E-11	1.38E+06	1.79E-04	1.29E-10
HC10-LC4	80.73	1.32							1.80E+06	1.52E-04	8.47E-11	1.21E+06	1.80E-04	1.49E-10

HC10- LC7	82.75	1.21										1.26E+06	1.89E-04	1.50E-10
HC15- LC4	86.56	1.3										1.44E+06	1.12E-04	7.79E-11
HC15- LC7	92.7	1.42										1.49E+06	1.16E-04	7.82E-11

5

10

15

20

2.10.6 Análisis por DSC y IEFc

[00270] Las curvas de fusión térmica de los fragmentos F(ab')₂ se analizaron mediante DSC. Los perfiles de F(ab')₂ de HC15-LC4 y F(ab')₂ de HC10-LC4 se muestran en la FIG. 8.

[00271] El pI de los mAbs 345A12-HC10-LC4 y 345A12-HC15-LC4 se analizó mediante cIEF (forma siglada de *capillary isoelectric focusing*, isoelectroenfoque capilar). El pI varió dentro de 0.06 unidades de pH entre cada mAb, 8.19 para 345A12-HC10-LC4 y 8.25 para 345A12-HC15-LC4 (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis por cIEF

Nombre de la muestra	pI	% de picos ácidos	% de pico neutro	% de picos básicos
345A12-HC10-LC4	8.19	24.412	57.171	18.417
345A12-HC15-LC4	8.25	34.787	50.790	14.424

2.10.7 Estabilidad en suero

[00272] La evaluación de la estabilidad en PBS/suero humano de los ADC 345A12-HC10-LC4 y 345A12-HC15-LC4 se probó durante hasta 10 días, como se describe en la Sección 2.7. Los datos se resumen a continuación en la Tabla 23.

Tabla 23. Estabilidad en PBS/suero humano *in vitro* de los ADC zu345A12-VCP-eribulina, HC15-LC4 frente a HC10-LC4

N.° de muestra	Descripción de la muestra	Dilución	Ab total				ADC intacto			
			Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0
1	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=0, en suero humano	1:2,000	231	2.14	462	ND	258	1.42	516	ND
2	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=24, en suero humano	1:2,000	221	4.59	442	-4.3	190	1.70	380	-26.4
3	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=48, en suero humano	1:2,000	208	0.840	416	-10.0	154	3.19	308	-40.3
4	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=72 en suero humano	1:2,000	213	1.46	426	-7.8	142	1.66	284	-45.0

			Ab total				ADC intacto			
N.° de muestra	Descripción de la muestra	Dilución	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0
5	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=96, en suero humano	1:2,000	210	2.55	420	-9.1	105	21.5	210	-59.3
10	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=240, en suero humano	1:2,000	207	4.27	414	-10.4	97.0	6.31	194	-62.4
15	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=0, en suero humano	1:2,000	284	0.387	568	ND	278	4.84	556	ND
	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=24, en suero humano	1:2,000	282	4.19	564	-0.7	229	2.71	458	-17.6

			Ab total				ADC intacto				
N.º de muestra	Descripción de la muestra	Dilución	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0	
5	9	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=48, en suero humano	1:2,000	273	0.103	546	-3.9	180	1.87	360	-35.3
10	10	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=72, en suero humano	1:2,000	258	0.744	516	-9.2	144	0.436	288	-48.2
	11	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=96, en suero humano	1:2,000	270	0.669	540	-4.9	135	3.13	270	-51.4
15	12	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=240, en suero humano	1:2,000	270	1.48	540	-4.9	111	0.669	222	-60.1

			Ab total				ADC intacto				
N.º de muestra	Descripción de la muestra	Dilución	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0	
5	13	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=0, en PBS	1:2,000	180	1.03	360	ND	229	1.40	458	ND
10	14	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=24, en PBS	1:2,000	184	0.583	368	2.2	187	2.07	374	-18.3
	15	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=48, en PBS	1:2,000	166	3.12	332	-7.8	177	1.64	354	-22.7
15	16	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=72 en PBS	1:2,000	180	0.829	360	0.0	177	2.00	354	-22.7
	17	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina	1:2,000	179	1.73	358	-0.6	174	3.87	348	-24.0

N.° de muestra	Descripción de la muestra	Dilución	Ab total				ADC intacto			
			Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0
5	T=96, en PBS									
18	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulina T=240, en PBS	1:2,000	171	0.915	342	-5.0	131	6.24	262	-42.8
10	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=0, en PBS	1:2,000	225	1.14	450	ND	233	0.325	466	ND
20	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=24, en PBS	1:2,000	226	1.45	452	0.4	209	3.53	418	-10.3
15	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=48, en PBS	1:2,000	233	0.754	466	3.6	210	0.942	420	-9.9

N.° de muestra	Descripción de la muestra	Dilución	Ab total				ADC intacto			
			Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0	Conc. media (ng/ml)	% de CV	Resultado ajustado (µg/ml)	% de diferencia desde T=0
22	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=72, en PBS	1:2,000	210	4.03	420	-6.7	186	2.11	372	-20.2
23	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=96, en PBS	1:2,000	247	10.4	494	9.8	182	0.0585	364	-21.9
24	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulina T=240, en PBS	1:2,000	226	0.514	452	0.4	145	6.91	290	-37.8

2.10.8 Estabilidad en matriz de 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina en diversas matrices utilizando un ensayo Octet sensible a la DAR

[00273] Se analizó la estabilidad *in vitro* de 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina (DAR2) en plasma y suero de ratón, rata, macaco cangrejero y humano. El ADC se incubó en matriz a 0.1 mg/ml durante 1 semana y se retiraron puntos de tiempo después de 1, 2, 3, 4 y 10 días. El análisis se realizó utilizando un ensayo basado en octet (inferometría de biocapa) sensible a la DAR como se describe en la Sección 2.3.1. Los resultados se muestran en la FIG. 9. 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina (DAR2) demostró una liberación de la carga útil dependiente del tiempo, con una liberación promedio del 20 % después de una incubación de 10 días a 37 °C.

2.10.9 Cultivos que producen IgG de conejo y anticuerpos policlonales contra mesotelina humana

[00274] En la semana 2, los pocillos que producían anticuerpo IgG de conejo se identificaron mediante FRET para IgG utilizando criptato de europio. Los pocillos que producían IgG se cribaron para detectar la presencia de anticuerpo Fcγ de IgG de conejo mediante ELISA frente a placas recubiertas con 1 µg/ml de CHO-MT40 mesotelina. Los cultivos que producían IgG de conejo específica de mesotelina se confirmaron mediante cribado por ELISA frente a 1 µg/ml de mesotelina y se contracribaron frente a 1 µg/ml de CD73-his. Se realizaron FRET y ELISA en el sistema robótico Biomek® FX (Beckman).

EJEMPLO 3: Estudios *in vivo*

[00275] Los ADC que comprendían conjugados de los anticuerpos anti-mesotelina humanizados principales y eribulina se evaluaron en ratones utilizando modelos de

xenoinjerto de cáncer gástrico y de pulmón humanos y un modelo de xenoinjerto obtenido de paciente (PDX, forma siglada de *patient-derived xenograft*) de mesotelioma humano de acuerdo con el protocolo que se describe a continuación.

5 Se evaluó la actividad antineoplásica y la toxicidad inespecífica de distintas especies de DAR de los ADC.

2

3.1 Reactivos y materiales

3.1.1 Anticuerpos

10 [00276] Los anticuerpos utilizados en los siguientes estudios tienen una cisteína desapareada en la posición 80 de la cadena ligera (LCcys80) e incluyen tanto la forma quimérica de conejo-humano (-xi) como la forma humanizada (-zu) de los anticuerpos anti-mesotelina humana xi345A12-HC1-LC2, xi102A6A2-HC1-LC2, zu345A12-HC1-LC2, zu345A12-HC10-LC4
15 y zu345A12-HC15-LC4.

3.1.2 Citotoxinas conjugables y ADC con LCcys80

[00277] Los compuestos de enlazador-citotoxina utilizados en los siguientes estudios incluyen maleimida-VCP-eribulina y maleimida-VCP-dímero de eribulina diOH.
20

3.1.3 Líneas celulares tumorales

[00278] En los siguientes estudios se utilizaron la línea celular de CPNM humano NCI-H2110, la línea celular de cáncer gástrico humano NCI-N87 y la línea celular cancerosa
25 de mesotelioma humano HAY. Todas las líneas celulares utilizadas se obtuvieron directamente de la American Type Culture Collection (ATCC), con la excepción de las células HAY, que se obtuvieron del NCI.

3.1.4 Otros reactivos

[00279] Todos los reactivos utilizados se obtuvieron de proveedores comerciales de calidad de investigación o superior, a menos que se indique lo contrario.

5 3.2 Estudios de cribado y eficacia *in vivo* en modelos de xenoinjerto de cáncer humano

3.2.1 Animales de estudio

[00280] Se utilizaron ratones hembra CD-1 IGS (forma siglada de *International Genetic Standarization*,
10 normalización genética internacional) (Charles River, 7-9 semanas de edad) para el estudio de dosis máxima tolerada (DMT), ratones hembra NOD.CB17-IDCG (Jackson Laboratory) para los estudios de xenoinjerto de NCI-H2110 y HAY, y ratones lampiños NCr hembra (Taconic, 5 semanas de edad)
15 para los estudios de xenoinjerto de NCI-N87. A su llegada, los animales se aclimataron durante 5-7 días antes de la inoculación. Los animales se instalaron a razón de 3-5 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad. Los animales se
20 etiquetaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio.

3.2.2 Cultivo celular

[00281] Se cultivaron células NCI-H2110, NCI-N87 o HAY criopreservadas de reservas congeladas en medio que
25 contenía los complementos necesarios. Las células se subcultivaron en medio completo durante 2 pases antes de usarlas para la inoculación *in vivo*.

3.2.3 Implantación de tumores, proceso de inclusión en el estudio y tratamiento

30 [00282] Se resuspendieron células en PBS mezclado con Matrigel enfriado en hielo a 1:1 (vol:vol) hasta una

concentración final de 1.0×10^8 células/ml o 5.0×10^7 células/ml para las células NCI-H2110 y HAY. Se inyectaron ratones por vía subcutánea con 100 μ l/ratón de mezcla celular y se controló el peso corporal y el crecimiento tumoral. Se tomaron mediciones con un compás calibrador digital 3 veces por semana a partir del día 3 posimplantación.

3.2.4 Medición y tratamiento de tumores

[00283] El volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula: $A \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} \times D \text{ (mm)} \times \pi/6$. Los ratones se aleatorizaron a cinco ratones por grupo una vez que los implantes tumorales alcanzaron un volumen promedio de 100 mm³. El tratamiento se proporcionó por vía intravenosa a un volumen de 200 μ l. Se midió y registró el peso corporal terminal al final de cada estudio.

3.2.5 Análisis estadístico

[00284] Los volúmenes tumorales de los animales de cada grupo de tratamiento se compararon con un grupo de control mediante un ANOVA bidireccional de medidas repetidas, seguido de una prueba posterior de Bonferroni. Además, se realizó la comparación del crecimiento tumoral dentro de cada grupo experimental utilizando el mismo análisis estadístico.

3.3 Estudios de eficacia *in vivo* en un modelo de PDX de mesotelioma humano

3.3.1 Animales de estudio

[00285] Se aclimataron ratones hembra NMRI nu/nu (Janvier Labs, 5-6 semanas) durante al menos 4 días a su llegada, antes de la inoculación. Los animales se instalaron a razón de 3-5 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad.

Los animales se marcaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio.

3.3.2 Xenotrasplante

[00286] El día 0 del estudio, se extrajeron tumores
5 Meso 7212 de cinco ratones donantes en condiciones estériles. El tejido tumoral donante se cortó en fragmentos de 2 x 2 mm y se colocó en una placa Petri estéril cubierta con solución salina al 0.9 %. En paralelo, los animales receptores se trataron por vía subcutánea con el analgésico Metacam®
10 (2 mg/kg) y después se anestesiaron mediante una única inyección intravenosa (0.15 ml/ratón) con Etomidat-Lipuro® (12 mg/kg). Se realizó una incisión vertical superficial en la piel de 5-8 mm en el costado izquierdo. Se insertó la punta de una tijera quirúrgica en la incisión, directamente
15 sobre el costado, y se utilizó para formar una bolsa en el espacio subcutáneo. Se implantó un fragmento de tumor por ratón en el bolsillo utilizando pinzas quirúrgicas. La incisión se cerró con una grapa metálica y los animales se colocaron de nuevo en una jaula limpia.

20 3.3.3 Procedimiento experimental

[00287] Durante la propagación del tumor se midieron los diámetros tumorales utilizando un compás calibrador digital (Mitutoyo). Los animales se asignaron aleatoriamente a grupos experimentales de acuerdo con el volumen de su tumor
25 (criterios de inclusión para el volumen tumoral, 0.1 - 0.3 cm³). Los volúmenes tumorales y los pesos corporales se registraron dos veces por semana.

3.3.4 Tratamiento

[00288] Se administró eribulina por vía intravenosa
30 en dosis de 0.2, 0.3 y 3.2 mg/kg el día de la aleatorización. Se administró MORAb-109 (DAR 0, 2 y 6) por vía intravenosa

en una dosis de 10.0 mg/kg el día de la aleatorización o una dosis de 2.5 mg/kg en cuatro días consecutivos. El volumen de administración fue de 10 ml/kg para inyecciones intravenosas en todos los grupos experimentales.

5 3.3.5 Análisis estadísticos

[00289] Se realizaron análisis estadísticos descriptivos sobre los datos para el volumen tumoral y el peso corporal. Los volúmenes tumorales de los animales de cada grupo de tratamiento se compararon con el grupo de control mediante el uso de un ANOVA bidireccional de medidas repetidas, seguido de una prueba posterior de Bonferroni. Adicionalmente, también se realizó la comparación del crecimiento tumoral de animales dentro de cada grupo con el mismo análisis estadístico.

15 3.4 Resultados - Cribado *in vivo* y estudios de eficacia

3.4.1 Estudio M109-004-2016: Cribado *in vivo* de los ADC de 345A12-HC1-LC2 y 102A6A2 HC1-LC2 dímero de eribulina en un modelo de xenoinjerto de CPNM humano

[00290] Se realizó un cribado comparativo *in vivo* de dos clones de anticuerpos anti-mesotelina (345A12-HC1-LC2 y 102A6A2-HC1-LC2) en un modelo de xenoinjerto de NCI-H2110 de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) humano. Los ratones se trataron con ADC de 345A12-HC1-LC2-dímero de eribulina diOH a 2.5 mg/kg o ADC de 102A6A2-HC1-LC2-dímero de eribulina diOH a 2.5 mg/kg. La actividad antitumoral y los cambios en el peso corporal para ambos ADC se muestran en la FIG. 10A y la FIG. 10B, respectivamente.

3.4.2 Estudio M109-006-2017: Evaluación preliminar de la dosis máxima de tolerancia (DMT) de los ADC de 345A12-

HC1-LC2 y 345A12-HC15-LC4 dímero de eribulina en ratones CD-1

[00291] Se midieron los cambios en el peso corporal de ratones hembra CD-1 después de la administración de 5, 10, 15 o 20 mg/kg de ADC de 345A12-HC1-LC2-dímero de eribulina diOH, o 5, 10 o 20 mg/kg de ADC de 345A12-HC15-LC4-dímero de eribulina diOH. Los cambios de peso corporal para cada ADC se muestran en la FIG. 11A y la FIG. 11B, respectivamente.

3.4.3 Estudio M109-007-2017: Cribado *in vivo* de los ADC de 345A12-HC10-LC4 y 345A12-HC15-LC4 dímero de eribulina en un modelo de xenoinjerto de CPNM humano

[00292] Se realizó un cribado comparativo *in vivo* de dos clones de anticuerpos anti-mesotelina adicionales (345A12-HC10-LC4 y 345A12-HC15-LC4) en un modelo de xenoinjerto de NCI-H2110 de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) humano. Los ratones fueron tratados con ADC 345A12-HC10-LC4-dímero de eribulina diOH ADC a 2.5 mg/kg o ADC 345A12-HC15-LC4-dímero de eribulina diOH a 2.5 mg/kg. La actividad antitumoral y los cambios en el peso corporal para ambos ADC se muestran en la FIG. 12A y la FIG. 12B, respectivamente.

[00293] El clon 345A12-HC15-LC4 se seleccionó basándose en su actividad antitumoral y su perfil de toxicidad como clon candidato para el anticuerpo utilizado en el ADC MORAb-109.

3.4.4 Estudio M109-010-2018: Efecto antitumoral de las especies de DAR2 y DAR6 del ADC 345A12-HC15-LC4-VCP-

eribulina (MORAb-109) en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano

[00294] Se compararon dos especies de DAR (DAR2 y DAR6) del ADC 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina (MORAb-109) en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano NCI-N87 a una dosis de 10 mg/kg. Las especies de ADC DAR2 y DAR6 demostraron respuestas antitumorales duraderas y similares (FIG. 13A), observándose poca o ninguna pérdida de peso después de la administración de cualquiera de las especies de DAR (FIG. 13B).

3.4.5 Estudio M109-010-2018: Efecto antitumoral de las especies de DAR2 y DAR6 del ADC 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina (MORAb-109) en un modelo de xenoinjerto de mesotelioma humano

[00295] Se compararon dos especies de DAR (DAR2 y DAR6) del ADC 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina (MORAb-109) en un modelo de xenoinjerto de mesotelioma humano HAY. Las especies de ADC de DAR2 y DAR6 demostraron respuestas antitumorales duraderas y similares en ratones tratados con una dosis única (5 mg/kg) de MORAb-109, mientras que la eribulina sola (administrada a la DMT (3.2 mg/kg) o a una cantidad molar equivalente de eribulina como se encuentra en MORAb-109 (0.1 mg/kg)) mostró efectos antitumorales limitados (FIG. 14A). Se observó pérdida de peso corporal aguda y temporal en los ratones tratados con la dosis DMT de eribulina, mientras que no se observó pérdida de peso corporal en los ratones tratados con ADC (FIG. 14B).

3.4.6 Efecto antitumoral de MORAb-109 (DAR6) en un modelo de PDX de mesotelioma humano

[00296] El efecto antitumoral del ADC 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina (MORAb-109) (DAR6) se investigó en un

modelo de PDX de mesotelioma humano, Meso7212 (MV15369). Se probaron dos regímenes de tratamiento distintos: una única administración de MORAb-109 10 mg/kg o cuatro administraciones diarias consecutivas de 2.5 mg/kg. Ambos regímenes de tratamiento de MORAb-109 demostraron respuestas antitumorales duraderas y comparables, mientras que la cantidad molar equivalente de eribulina sola (0.2 mg/kg) mostró efectos antitumorales limitados (FIG. 15A). Ambos tratamientos con ADC MORAb-109 mostraron una actividad antitumoral significativamente aumentada en comparación con la dosis DMT de eribulina sola ($P < 0.05$). Los cambios de peso corporal para todos los tratamientos se muestran en la FIG. 15B.

3.4.7 Efecto antitumoral de MORAb-109 (DAR2 y DAR6) en un modelo de PDX de mesotelioma humano

[00297] Se investigó el efecto antitumoral de dos especies de DAR (DAR2 y DAR6) del ADC 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulina (MORAb-109) en un modelo de PDX de mesotelioma humano, Meso7212 (MV16071), a una sola administración de 10 mg/kg. Ambas especies DAR2 y DAR6 de MORAb-109 demostraron respuestas antitumorales duraderas y comparables, mientras que la cantidad molar equivalente de eribulina sola (0.3 mg/kg) y la especie MORAb-109 no conjugada con eribulina (DAR0) mostraron efectos antitumorales limitados o nulos (FIG. 16A). No se observó pérdida de peso corporal en ningún grupo (FIG. 16B). No hubo diferencia estadística del efecto antitumoral entre las especies DAR2 y DAR6 de MORAb-109.

EJEMPLO 4: Expresión de mesotelina (MSLN) y potencia *in vitro*

4.1 Métodos

[00298] Citotoxicidad: Las células se subcultivaron y sembraron a 5,000 células/pocillo en medio de crecimiento completo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante una noche (16 horas).
5 Los reactivos de prueba se diluyeron en serie 1:3 en placas de dilución de pocillos profundos de 2 ml, comenzando a 200 nM (10 diluciones en total). Se añadieron las muestras diluidas (100 µl) a las placas de células (concentración inicial de las muestras de prueba a 100 nM). Las placas se
10 incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 5 días adicionales. A continuación, se descartó el medio y las placas se lavaron una vez con 200 µl de DPBS, se tiñeron con 50 µl de solución de cristal violeta al 0.2 % a temperatura ambiente durante 15 min y después se lavaron abundantemente con agua del
15 grifo. Las placas se secaron al aire y se disolvió cristal violeta con 200 µl de solución de SDS al 1 %. Las placas se leyeron a 570 nm. Los datos se analizaron en cuanto a la determinación de la CI₅₀ utilizando GraphPad Prism 6. El análisis de correlación se realizó en GraphPad Prism
20 utilizando un análisis de Spearman no paramétrico.

4.2 Resultados

[00299] Se observó una correlación entre la potencia de MORAb-109 (DAR6) y la expresión de mesotelina para todas las líneas celulares (FIG. 17; Tablas 24 y 25).
25 [00300] Para MORAb-109 (DAR2), cuando se excluyeron del análisis las líneas celulares que tenían una expresión de mesotelina más baja (tinción de FACS de intensidad de fluorescencia media (IFM) < 80), se observó una correlación significativa entre la potencia y la expresión de mesotelina
30 (FIG. 17; Tablas 24 y 25). La potencia de MORAb-109 (DAR2)

se correlacionó con la expresión de mesotelina a niveles más altos de expresión de mesotelina.

Tabla 24. Análisis de correlación de potencia y expresión de mesotelina (DAR2 y DAR6)

	MSLN (IFM) frente a Eribulina	MSLN (IFM) frente a MORAb109	MSLN (IFM) frente a MORAb109 (DAR6)	MSLN (IFM) frente a MORAb109_MSLN alta
r de Spearman				
r	-0.1113	-0.2906	-0.6773	-0.6267
Intervalo de confianza del 95 %	-0.3935 a 0.1902	-0.5472 a 0.01591	-0.8093 a -0.4803	-0.8502 a -0.2118
Valor de P				
P (bilateral)	0.4566	0.0557	<0.0001	0.0054
Resumen de valor de P	ns	ns	****	**
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximado	Aproximado	Aproximado	Aproximado
¿Significativo? (alfa = 0.05)	No	No	Sí	Sí
Número de parejas XY	47	44	48	18

Tabla 25. Líneas celulares utilizadas en la expresión de mesotelina y análisis de correlación de potencias

	Líneas celulares	MSLN (IFM)	Potencia <i>in vitro</i> , CI50, nM		
			Eribulina	MORAb109 (DAR2)	MORAb109 (DAR6)
5	EGI-1	14.8	1.48	187.8	15.45
	TFK1	132.81	1.27		5.65
	SNU-245	23.9	78.24	355.8	
10	SNU-478	53.8	1.58	227.5	55.16
	SNU-1196	40.2	1.14	128.4	6.49
	T-47D	4.4	0.68	95.86	22.04
	JIMT-1	36.4	0.39	61.8	11.4
	HCC1806	189.3	0.37	35.54	0.24
15	HEC-1-A	16.5	0.68	140.7	23.7
	HEC-1-B	16.9	0.54	66.29	1.6
	HEC-251	53.3	0.5	67.15	0.67
	MFE-280	45.1	3.24	196.5	164.9
	NCI-H292	108.6	0.58	147.3	6.37
20	NCI-H322	83.9	0.46	62.84	3.62
	NCI-H1355	11.5	0.67	79.77	7.09
	clasificado como NCI-H1355	32.7	0.7	96.92	6.48
	NCI-H1573	17.4		60.41	6.46
25	NCI-H1568/MSLN	4474	0.44	1.69	1.08
	NCI-H1650	31.5	0.61	92.2	4.09
	NCI-H1650/MSLN	1865.5	0.84	1	0.57
	NCI-H2110	112.2	0.32	52.23	4.17
	NCI-H2126	73.6	0.53	87.89	10.82
30	PC9	11.24	0.56	85.14	15.22

5	H226	725.3	0.66	7.46	0.13
	NCI-H23	4.42	0.6	66.74	17.31
	Lu65	13.13	0.56		15.85
	NCI-H460	8.56	35.29		
	MOR/CPR	120.79	3.69		5.68
10	A549	14.2	2.72	276	41.33
	CNE2	147.7	0.49	69.55	1.64
	HK1	39.2	0.89	197.5	5.88
	HNE-1	110.8	0.87	239.2	2.03
	HNE-1-T1	79.3	1.03	347	11.28
15	HONE1	108.6	0.89	197.5	5.88
	SUNE1	212.4	0.56	77.8	0.27
	CaOV-3	137.6	0.44	20.93	0.51
	COV362	113.5	2.78	193	45.29
	HAC-2	172.3	26.65	228	320
20	Kuramochi	211.2	0.89	897.8	0.1
	OVCAR3 A1	220	0.15	0.005	0.005
	AsPC1	33.47	1.62		3.13
	BxPC3	15.59	0.66	86.2	5.88
	Capan-2	36	1.21	138	1.99
25	A431	5.6	0.55	71.51	14.17
	A431-K5	1430.3	1.5	0.45	0.35
	NCI-N87	125.8	0.11	14.7	0.1
	MKN1	22.06	0.96	20.14	2.89
	MKN74	7.73	0.78	66.96	9.62
30	SNU216	94.91	1.78	73.42	0.29
	MKN45	57.94	3.65	100	10.39
	MKN7	18.48	0.58	86.53	10.39

EJEMPLO 5: Respuesta a la dosis de MORAb-109 en el modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano (NCI-N87)

5.1 Métodos

5.1.1 Eficacia *in vivo*

5 **[00301]** Animales: Se aclimataron durante 5-7 días antes de la inoculación ratones lampiños NCr hembra (Taconic), de 5 semanas de vida en el momento de su llegada. Los animales se instalaron a razón de 3-5 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad. Los animales se
10 etiquetaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio.

[00302] Cultivo de células: Se descongelaron células NCI-N87 criopreservadas y se cultivaron en medio que contenía
15 los complementos necesarios. Las células se subcultivaron en medio completo durante 2 pases antes de usarlas para la inoculación *in vivo*.

[00303] Implantación de tumores, proceso de inclusión en el estudio y tratamiento: La suspensión celular en PBS se
20 mezcló con Matrigel enfriado en hielo a 1:1 (vol:vol), hasta una concentración final de 1.0×10^8 células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l/ratón de la mezcla. Los ratones se controlaron en cuanto a su bienestar clínico con mediciones del peso corporal y los tumores con un compás calibrador
25 digital, 3 veces por semana, comenzando el día 3 posimplantación.

[00304] Medición y tratamiento de tumores: El volumen tumoral (VT) (mm^3) se calculó utilizando la fórmula: $A \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} \times D \text{ (mm)} \times \pi/6$. Cuando los tumores alcanzaron
30 aproximadamente 100 mm^3 en promedio, los animales se aleatorizaron a 5 por grupo. El tratamiento se proporcionó

por vía intravenosa en un volumen de 200 µl del artículo de prueba. Al final del estudio, se midió y registró el peso corporal terminal.

[00305] Análisis estadístico: Se realizaron análisis estadísticos descriptivos sobre los datos de volumen tumoral y peso corporal. Los volúmenes tumorales de los animales de cada grupo de tratamiento se compararon con el grupo de control mediante el uso del ANOVA bidireccional de medidas repetidas, seguido de la prueba posterior de Bonferroni. Adicionalmente, se realizó la comparación del crecimiento tumoral de animales dentro de cada grupo con el mismo análisis estadístico.

5.1.2 Farmacocinética (PK)

[00306] El análisis de PK se realizó utilizando un ensayo de ADC intacto y un ensayo de anticuerpos totales. Anticuerpos totales se refiere a la suma total de todas las especies, incluidas las especies conjugadas y no conjugadas (es decir, DAR0 + DAR1 + DAR2 + ... + DARn), mientras que ADC intacto se refiere a todas las especies conjugadas (es decir, DAR1 + DAR2 + ... + DARn). En el ensayo de anticuerpos totales se utilizó mesotelina biotinilada para la captura. En el ensayo de ADC intacto se utilizó un fragmento Fab anti-eribulina 5E4 biotinilado para la captura y anti-Fc humano marcado con AlexaFluor647 para la detección. El análisis de las muestras se realizó en un analizador Gyros. El análisis de datos se realizó en WatsonLIMS 7.4.1 y se representó gráficamente en Microsoft Excel.

5.2 Resultados

[00307] Se observó una eficacia dependiente de la dosis para intervalos de dosis de MORAb-109 (DAR2) de 5 mg/kg a 25 mg/kg (FIG. 18A y 18B). No se observó pérdida de peso

corporal en ningún grupo de dosis (FIG. 18C). En los animales tratados se observó una exposición de ADC dependiente de la dosis, como lo indican los aumentos dependientes de la dosis en el ABC (FIG. 19 y Tabla 26).

5 **Tabla 26. PK de MORAb-109 (titulación de dosis) en ratones portadores de tumores NCI-N87**

Dosis (mg/kg)	ADC intacto o Ab total	T _{1/2} (horas)	V _d _{eq} (ml/kg)	CL (ml/kg/hora)	ABC (µg*hora/kg)	C _{máx} (µg/ml)
5	Intacto	125.1	78.7	0.509	9512	62.9
	Total	173.9	75.1	0.316	14375	73.2
10	Intacto	148.2	99.5	0.475	19559	105
	Total	231.6	89.6	0.259	31631	123
15	Intacto	142.1	81.1	0.414	34557	169
	Total	209.2	68.8	0.236	56134	205
20	Intacto	151.5	90.9	0.429	43852	214
	Total	218.6	70.6	0.230	75718	270
25	Intacto	143.5	91.1	0.463	51253	271
	Total	226.1	78.2	0.240	88099	322

15 **EJEMPLO 6: Eficacia antitumoral *in vivo* de MORAb-109 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano (OVCAR-3-A1-T1)**

6.1 Métodos

20 **[00308]** Animales: Se aclimataron durante 5-7 días antes de la inoculación ratones NOD.CB17-IDCG (Jackson Laboratory), de 5 semanas de vida en el momento de su llegada. Los animales se instalaron a razón de 3-5 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad. Los animales se
25 etiquetaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio.

[00309] Cultivo de células: Se descongelaron células OVCAR-3-A1-T1 criopreservadas y se cultivaron en medio que
30 contenía los complementos necesarios. Las células se

subcultivar en medio completo durante 2 pases antes de usarlas para la inoculación *in vivo*.

5 **[00310]** Implantación de tumores, proceso de inclusión en el estudio y tratamiento: La suspensión celular en PBS se mezcló con Matrigel enfriado en hielo a 1:1 (vol:vol), hasta una concentración final de 5.0×10^7 células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l/ratón de la mezcla. Los ratones se controlaron en cuanto a su bienestar clínico con mediciones del peso corporal y los tumores con un compás calibrador digital, 3 veces por semana, comenzando el día 3 posimplantación.

15 **[00311]** Medición y tratamiento de tumores: El volumen tumoral (VT) (mm^3) se calculó utilizando la fórmula: $A \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} \times D \text{ (mm)} \times \pi/6$. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 en promedio, los animales se aleatorizaron a 5 por grupo. El tratamiento se proporcionó por vía intravenosa en un volumen de 200 μ l del artículo de prueba. Al final del estudio, se midió y registró el peso corporal terminal.

20 **[00312]** Análisis estadístico: Se realizaron análisis estadísticos descriptivos sobre los datos de volumen tumoral y peso corporal. Los volúmenes tumorales de los animales de cada grupo de tratamiento se compararon con el grupo de control mediante el uso del ANOVA bidireccional de medidas repetidas, seguido de la prueba posterior de Bonferroni. Adicionalmente, se realizó la comparación del crecimiento tumoral de animales dentro de cada grupo con el mismo análisis estadístico.

6.2 Resultados

[00313] MORAb-109 (DAR2) demostró un retraso del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano OVCAR-3-A1-T1 (FIG. 20A y la FIG. 20B).

EJEMPLO 7: Eficacia antitumoral in vivo de MORAb-109 en el modelo de PDX de CPNM humano (LC-F-25)

7.1 Métodos

[00314] Animales: Ratones hembra atímicos (nu/nu) exogámicos (HSD:atímico lampiño-Foxn1nu), de 5 semanas de vida en el momento de su llegada, se aclimataron durante al menos 4 días antes de la inoculación. Los animales se instalaron a razón de 3-5 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad. Los animales se marcaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio.

[00315] Xenotrasplante: LC-F-25 se estableció como un tumor en crecimiento (P9.1.1/0) de un paciente humano con adenocarcinoma de pulmón no microcítico primario. LC-F-25 tiene una expresión de MSLN más baja en términos de porcentaje de positividad e intensidad global, basándose en el análisis de inmunohistoquímica (IHQ), con respecto a otros tipos de tumores (como, por ejemplo, LXFA-737 (Ejemplo 8)).

[00316] Procedimiento experimental: Treinta y un (31) ratones con un tumor de LC-F-25 (P9.1.1/0) en crecimiento establecido de entre 108 y 288 mm³ se asignaron al tratamiento cuando el volumen tumoral medio y mediano alcanzó los 153.5 y 126 mm³, respectivamente.

[00317] Tratamiento: La eficacia se evaluó en 4 grupos de 7 a 8 ratones cada uno:

- En el grupo 1, el vehículo se dosificó a una dosis única de 5 ml/kg, i.v., el día 1.

- En los grupos 2 y 3, la eribulina se dosificó a una dosis única, respectivamente a 0.1 mg/kg (5 ml/kg) y 3.2 mg/kg (6.4 ml/kg), i.v., el día 1.

- En el grupo 4, MORAb-109 se dosificó a una
5 dosis única de 10 mg/kg (5 ml/kg, i.v., el día 1.

[00318] Se midieron los tumores y se pesaron los ratones dos veces por semana durante el período experimental.

[00319] Análisis estadístico: Se realizó un análisis estadístico para cada medición mediante una prueba de
10 comparación no paramétrica de Mann-Whitney. Cada grupo tratado se comparó con el grupo de control.

7.2 Resultados

[00320] MORAb-109 (DAR2) proporcionado en una dosis
15 única de 10 mg/kg por vía intravenosa fue bien tolerado sin pérdida de peso corporal por los ratones portadores de tumor de LC-F-25 (FIG. 21B). MORAb-109 (DAR2) demostró un retraso del crecimiento tumoral a 10 mg/kg en el modelo de PDX de CPNM de LC-F-25 (FIG. 21A).

[00321] La eribulina proporcionada a una dosis única
20 de 0.1 mg/kg (la cantidad molar equivalente de carga útil en MORAb-109 cuando se administró a 10 mg/kg) por vía intravenosa fue bien tolerada por los ratones portadores de tumor de LC-F-25, pero no indujo inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (FIG. 21A y la FIG.
25 21B).

[00322] La eribulina proporcionada a una dosis única
de 3.2 mg/kg (dosificación de DMT de ratón o 32 veces mayor que la cantidad molar de eribulina en MORAb-109 cuando se administra a 10 mg/kg) por vía intravenosa fue bien tolerada
30 por los ratones portadores de tumor de LC-F-25, pero indujo

una pérdida de peso corporal leve y transitoria de 3 a 10 días después de la administración (FIG. 21B). A esta dosis, la eribulina indujo una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa, con regresiones parciales del tumor en 6 de 8 ratones (FIG. 21A).

EJEMPLO 8: Eficacia antitumoral in vivo de MORAb-109 en el modelo de PDX de CPNM humano (LXFA-737)

8.1 Métodos

[00323] Animales: Ratones hembra NMRI nu/nu (Crl:NMRI-Foxn1nu), de 4 a 6 semanas de edad.

[00324] Xenotrasplante: LXFA-737 se estableció un tumor en crecimiento (P14N4) de un paciente humano con adenocarcinoma de pulmón no microcítico primario. LXFA-737 tiene una expresión de MSLN moderada en términos de intensidad global y porcentaje de positividad más alto, basándose en el análisis por IHQ, con respecto a otros tipos de tumores (tales como, por ejemplo, LC-F-25 (Ejemplo 7)).

[00325] Procedimiento experimental: Los animales se controlaron hasta que los implantes tumorales alcanzaron los criterios de volumen de estudio de 50-250 mm³ (por ejemplo, 80-200 mm³) en un número suficiente de animales. Los ratones se asignaron a grupos, con el objetivo de que la mediana y la media de los volúmenes tumorales fueran comparables. El día de la aleatorización se designó como el día 0.

[00326] Tratamiento: La eficacia se evaluó en 4 grupos de 6 a 7 ratones cada uno:

- En el grupo 1, el vehículo se dosificó a una dosis única de 5 ml/kg, i.v., el día 1.

- En los grupos 2 y 3, la eribulina se dosificó a una dosis única, respectivamente a 0.2 mg/kg y 3.2 mg/kg, i.v., el día 1.

- En el grupo 4, MORAb-109 se dosificó a una dosis única de 10 mg/kg i.v. el día 1.

[00327] Se midieron los tumores y se pesaron los ratones dos veces por semana durante el período experimental. El primer día de dosificación fue el día 1, un día después de la aleatorización (día 0).

10 [00328] Análisis estadístico: Inhibición del crecimiento tumoral, valor de prueba/control en % (T/C mín.): El valor de prueba frente al del control (T/C en %) se calculó a partir de la relación de los valores del volumen tumoral residual (VTR) mediano de los grupos de prueba frente a los de control en el día X multiplicado por 100. El tiempo de duplicación y cuadruplicación (Td, Tc) del volumen tumoral para los grupos de prueba y de control se definió como el intervalo de tiempo (en días) necesario para que un grupo alcanzara una mediana del VTR del 200 % o el 400 %.

20 8.2 Resultados

[00329] MORAb-109 (DAR2) demostró una sólida eficacia antitumoral (T/C mínima, 2.3 % el día 41) a 10 mg/kg en el modelo de PDX de CPNM LXFA-737 (FIG. 22A) y su Tc no se alcanzó durante el estudio. MORAb-109 proporcionado en dosis única también fue bien tolerado sin pérdida de peso corporal por los ratones portadores de tumores LXFA-737 (FIG. 22B).

[00330] La eribulina proporcionada a una dosis única de 3.2 mg/kg (dosificación de DMT de ratón o 32 veces mayor que la cantidad molar de eribulina en MORAb-109 cuando se administra a 10 mg/kg) por vía intravenosa fue bien tolerada

por los ratones portadores de tumor de LXFA-737, mostró eficacia antitumoral (T/C mínimo, 4.2 % en el día 27), y su Tc fue del 80.1 %. Sin embargo, la eribulina indujo una pérdida de peso corporal leve y transitoria después de la administración (FIG. 22A y la FIG. 22B). Una dosis única de 0.2 mg/kg, el doble de la cantidad molar de la eribulina en MORAb-109 cuando se administra a 10 mg/kg, mostró una eficacia antitumoral limitada (T/C mínima, 51.1 % en el día 44).

10 **EJEMPLO 9: Respuesta a la dosis de MORAb-109 en el modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano (NCI-N87)**

9.1 Métodos

9.1.1 Eficacia *in vivo*

[00331] Animales: Se aclimataron durante 5-7 días antes de la inoculación ratones lampiños NCr hembra (Taconic), de 5 semanas de vida en el momento de su llegada. Los animales se instalaron a razón de 3-5 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad. Los animales se etiquetaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio.

[00332] Cultivo de células: Se descongelaron células NCI-N87 criopreservadas y se cultivaron en medio que contenía los complementos necesarios. Las células se subcultivaron en medio completo durante 2 pases antes de usarlas para la inoculación *in vivo*.

[00333] Implantación de tumores, proceso de inclusión en el estudio y tratamiento: La suspensión celular en PBS se mezcló con Matrigel enfriado en hielo a 1:1 (vol:vol), hasta una concentración final de 1.0×10^8 células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l/ratón de la mezcla. Los ratones se

controlaron en cuanto a su bienestar clínico con mediciones del peso corporal y los tumores con un compás calibrador digital, 3 veces por semana, comenzando el día 3 posimplantación.

5 **[00334]** Medición y tratamiento de tumores: El volumen tumoral (VT) (mm^3) se calculó utilizando la fórmula: $A \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} \times D \text{ (mm)} \times \pi/6$. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 en promedio, los animales se aleatorizaron a 5 por grupo. El tratamiento se proporcionó
10 por vía intravenosa en un volumen de $200 \mu\text{l}$ del artículo de prueba. Al final del estudio, se midió y registró el peso corporal terminal.

[00335] Análisis estadístico: Se realizaron análisis estadísticos descriptivos sobre los datos de volumen tumoral
15 y peso corporal. Los volúmenes tumorales de los animales de cada grupo de tratamiento se compararon con el grupo de control mediante el uso del ANOVA bidireccional de medidas repetidas, seguido de la prueba posterior de Bonferroni. Adicionalmente, se realizó la comparación del crecimiento
20 tumoral de animales dentro de cada grupo con el mismo análisis estadístico.

25

30

9.1.2 Farmacocinética (PK)

[00336] El análisis de PK se realizó utilizando un ensayo de ADC intacto y un ensayo de anticuerpos totales. Anticuerpos totales se refiere a la suma total de todas las especies, incluidas las especies conjugadas y no conjugadas (es decir, DAR0 + DAR1 + DAR2 + ... + DARn), mientras que ADC intacto se refiere a todas las especies conjugadas (es decir, DAR1 + DAR2 + ... + DARn). El ensayo de anticuerpos totales utilizó mesotelina biotinilada para la captura y anti-Fc humano marcado con AlexaFluor647 para la detección. En el ensayo de ADC intacto se utilizó anti-eribulina 5E4 biotinilado para la captura y anti-Fc humano marcado con AlexaFluor647 para la detección. El análisis de las muestras se realizó en un analizador Gyros. El análisis de datos se realizó en WatsonLIMS 7.4.1 y se representó gráficamente en Microsoft Excel. La eribulina se cuantificó utilizando LC-MS de muestras de plasma, tumor y médula ósea.

9.1.3 LC-MS

[00337] Para el análisis se utilizaron 20-50 µl de plasma de MORAb-109 (DAR2) de ratones individuales o 50 µl de plasma igualmente agrupado de ratones a los que se les administró dosis de MORAb-109 (DAR6). Se incubaron Dynabeads M-280 estreptavidina (100 µl) con 3 µg de conjugado de Fc de IgG humana biotina para PK capture select seleccionada durante 1 hora a temperatura ambiente, después se lavó con tampón HBS-EP. Las muestras de plasma diluidas en tampón HBS-EP se mezclaron después con perlas formando complejo/lavadas para la captura de complejos MORAb-109, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron dos veces en tampón HBS-EP. Las perlas lavadas que contenían el complejo se desglucosilaron con Rapid PNGaseF

(1 μ L) en tampón de PNGasa durante 1 hora a 37 °C, después se lavaron una vez en tampón HBS-EP. La elución de MORAb-109 capturado/desglucosilado se realizó con acetonitrilo al 10 % con ácido fórmico al 0.1 % (30 μ l). Se analizó la masa
 5 intacta o reducida de las muestras con análisis con UPLC Synapt G2/clase M.

9.2 Resultados

[00338] El efecto antitumoral y el cambio de peso corporal en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano de NCI-N87 tratado con una dosis única de MORAb-109
 10 (DAR2 o DAR6) a 10 mg/kg se muestran en la FIG. 23A y la FIG. 23B, respectivamente.

[00339] El análisis de PK de MORAb-109 (DAR2), MORAb-109 (DAR6) y el anticuerpo no conjugado se muestra en la
 15 Tabla 27. El anticuerpo total para MORAb-109 (DAR2) y sin conjugar fue similar, mientras que MORAb-109 (DAR6) fue menor, lo que indica que MORAb-109 (DAR2) es estable en circulación.

[00340] El análisis de la DAR de los ADC de muestras de plasma indicó que la tasa de liberación de la carga útil fue más alta para las especies de DAR6 y contribuyó a niveles más altos de eribulina en plasma (Tablas 28 y 29).

Tabla 27. Perfil PK de MORAb-109 (DAR2 y DAR6) en ratones portadores de tumor de NCI-N87

25

DAR2						
Parámetros	Unidad	ADC	Ab total	ERI en plasma	ERI en tumor	ERI en médula ósea
30 CL _{tot}	ml/h/kg	0.71	ND	ND	ND	ND

	V _{deq}	ml/kg	121	ND	ND	ND	ND
5	ABC _{0-inf}	mg×h/ml	14.2	20.9	44.0 (ng×h/ ml)	17.8 (μg×h/ ml)	9.9 (μg×h/m l)
	T _{máx}	hora	ND	0.17	0.17	24	1
10	C _{máx}	μg/ml	ND	137	0.65 (ng/ml)	64 (ng/g)	121 (ng/g)
	T _{1/2}	hora	134	191	59	162	151
	DAR6						
	CL _{tot}	ml/h/kg	0.73	ND	ND	ND	ND
15	V _{deq}	ml/kg	100	ND	ND	ND	ND
	ABC _{0-inf}	mg×h/ml	13.7	14.4	121 (ng×h/ ml)	16.0 (μg×h/ ml)	6.7 (μg×h/m l)
20	T _{máx}	hora	ND	0.17	1	24	3
	C _{máx}	μg/ml	ND	148	2.6 (ng/ml)	96 (ng/g)	94 (ng/g)
	T _{1/2}	hora	103	129	33	98	76
25	Ab libre						
	CL _{tot}	ml/h/k g		0.54			
	V _{deq}	ml/kg		126			
30	ABC _{0-inf}	mg×h/ml		18.5			

C _{máx}	µg/ml		183
T _{1/2}	hora		<u>164</u>

Tabla 28. DAR de MORAb-109 (DAR2) en plasma

Horas	1	2	3	DAR promediado
0.167	1.92	1.93	1.94	1.93
8	1.88	1.86	1.92	1.89
24	1.83	1.86	1.90	1.86
48	1.87	1.82	1.83	1.84
96	1.83	1.65	1.78	1.75
168	1.69	1.75	1.63	1.69
336	1.38	1.54	1.64	1.52
504	1.08	1.18	1.63	1.30

Tabla 29. DAR de MORAb-109 (DAR6) en plasma

Tiempo (horas)	Cadena L	Cadena H	DAR promediado
0.167	1.52	1.23	5.52
8	1.46	1.13	5.18
24	1.26	0.81	4.15
48	1.25	0.71	3.91
96	1.27	0.44	3.42
168	0.93	0.38	2.61
336	0.86	0.35	2.41
504	N.D.	N.D.	N.P.

EJEMPLO 10: Comparación de 345A12 HC15 LC4 con anetumab - Afinidad de unión

10.1 Métodos

[00341] Anticuerpos: 345A12 HC15 LC4 (el anticuerpo anti-mesotelina en MORAb-109) y anetumab. Las secuencias para anetumab, un anticuerpo humano anti-mesotelina, se exponen en la Tabla 30.

[00342] Afinidad de unión: Las mediciones de unión se realizaron en tampón HBS-P+ en un instrumento BIAcore T-

100. Los anticuerpos se diluyeron a 1 µg/ml en HBS-P+. Las muestras se centrifugaron a 14,000 x g durante 5 min a temperatura ambiente y después los sobrenadantes se transfirieron a un tubo de BIAcore nuevo de 1.5 ml y se taparon. La mesotelina (50 µg) se diluyó a 100 nM en tampón HBS-P+ 1x, después se diluyó en serie con factor 5 a 100, 20, 4, 0.8 y 0.16 nM en tubos de BIAcore y se tapó. El chip de captura anti-anticuerpos humanos se preparó de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando un chip CM5 con asistente de inmovilización. Los niveles finales de anticuerpos de captura fueron de 8000-9000 UR, en HBS-P+. El chip se preparó para el ensayo con cinco ciclos de inyección de tampón de 300 segundos seguidos de una regeneración de 30 segundos, todo a 30 µl/min en las cuatro celdas de flujo.

15 **[00343]** Los anticuerpos se capturaron en las celdas de flujo 2-4 mediante inyecciones secuenciales de soluciones de ligandos individuales durante 90 segundos a 10 µl/min. La inyección del analito se realizó con una cinética de ciclo único mediante inyecciones secuenciales de soluciones de analito de baja a alta concentración durante 240 segundos cada una a 30 µl/min. La detección fue 2-1, 3-1, 4-1. La doble referenciación se realizó mediante una secuencia de inyecciones de captura de ligando idénticas, seguida de 5 inyecciones de tampón solo durante 240 segundos cada una, disociación durante 1800 segundos y regeneración como se indicó anteriormente. Se analizó la unión a mesotelina de todos los ligandos por duplicado. El análisis cinético se realizó utilizando el programa informático BIAE Evaluations utilizando un modelo de ajuste de Langmuir 1:1. Se promediaron las constantes de asociación, la constante de disociación y de afinidad a partir de ejecuciones duplicadas.

10.2 Resultados

[00344] 345A12 HC15 LC4 presentó una afinidad 40 veces mayor que anetumab (Tabla 31). 345A12 HC15 LC4 conservó la afinidad de unión a la mesotelina de macaco cangrejero, mientras que anetumab no se unió a la mesotelina de macaco cangrejero. Ningún anticuerpo se unió a la mesotelina de rata.

Tabla 30. Secuencias del anetumab

10	Cadena de IgG	AN/AA	SEQ ID	Secuencia
15	Cadena pesada	Aminoácido	51	QVELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ APGKGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQGGVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARGQLYGGTYMDGWGQGTTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20		Ácido nucleico	52	CAGGTTGAACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAG CCTGGCGAGAGCCTGAAGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGC TACAGCTTCACCAGCTATTGGATCGGCTGGGTTTCGACAG GCCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGATGGGAATCATCGAC CCCGGCGACAGCAGAACCAGATACAGCCCTAGCTTTTCAG GGCCAAGTGACCATCAGCGCCGACAAGAGCATCAGCACA GCCTACCTGCAGTGGTCTAGCCTGAAAGCCAGCGACACC GCCATGTACTATTGTGCCAGAGGCCAGCTGTACGGCGGC ACCTATATGGATGGATGGGGCCAGGGCACACTGGTCACA GTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCA CTGGCTCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGTGGAACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCTGAGCCT
30				

Cadena de IgG	AN/AA	SEQ ID	Secuencia
			GGCAGCAAGAGCGGCAATACCGCCTCTCTGACAATTAGC GGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGATTACTACTGCAGC AGCTACGACATCGAGAGCGCCACACCTGTGTTTGGCGGC GGAACAAAACCTGACAGTGCTGGGCCAACCTAAGGCCGCT CCTAGCGTTACACTGTTCCACCTAGCAGCGAGGAACTG CAGGCTAACAAGGCCACACTCGTGTGCCTGATCAGCGAT TTTTACCCTGGCGCCGTGACAGTGGCCTGGAAAGGCGAT AGTTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAACACCACACCT AGCAAGCAGAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCTCCTAC CTGAGCCTGACACCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGATCC TACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGA AAAACAGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC

Tabla 31. Unión de 345A12 HC15 LC4 y anetumab a mesotelina humana, de macaco cangrejero y de rata

		k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
ser humano	345A12 HC15 LC4	$1.46 \pm 0.05 \times 10^6$	$2.85 \pm 0.14 \times 10^{-4}$	$1.95 \pm 0.16 \times 10^{-10}$
	anetumab	$1.68 \pm 0.64 \times 10^5$	$1.12 \pm 1.00 \times 10^{-3}$	$7.26 \pm 2.29 \times 10^{-9}$
macaco cangrejero	345A12 HC15 LC4	$1.05 \pm 1.15 \times 10^4$	$7.51 \pm 5.76 \times 10^{-4}$	$8.86 \pm 5.16 \times 10^{-8}$
	anetumab	sin unión	sin unión	sin unión
rata	345A12 HC15 LC4	sin unión	sin unión	sin unión
	anetumab	sin unión	sin unión	sin unión

EJEMPLO 11: Comparación de MORAb-109 con BAY 94-9343 - Potencia *in vitro*

11.1 Métodos

[00345] Los ADC: Se evaluaron MORAb-109 (DAR2 y DAR6) y anetumab ravidansina (BAY 94-9343). Anetumab ravidansina, también denominado BAY 94-9343, es un ADC que comprende anetumab conjugado con el inhibidor de tubulina maitansinoide DM4 a través de un enlazador que contiene disulfuro (un enlazador SPDB reducible [N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato]). BAY 94-9343 se generó como se describe en el Ejemplo 15.

[00346] Citotoxicidad: Las células se subcultivaron y sembraron a 5,000 células/pocillo en medio de crecimiento completo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante una noche (16 horas).
5 Los reactivos de prueba se diluyeron en serie 1:3 en placas de dilución de pocillos profundos de 2 ml, comenzando a 200 nM (10 diluciones en total). Se añadieron las muestras diluidas (100 µl) a las placas de células (concentración inicial de las muestras de prueba a 100 nM). Las placas se
10 incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 5 días adicionales. A continuación, se descartó el medio y las placas se lavaron una vez con 200 µl de DPBS, se tiñeron con 50 µl de solución de cristal violeta al 0.2 % a temperatura ambiente durante 15 min y después se lavaron abundantemente con agua del
15 grifo. Las placas se secaron al aire y se disolvió cristal violeta con 200 µl de solución de SDS al 1 %. Las placas se leyeron a 570 nm. Los datos se analizaron en cuanto a la determinación de la CI₅₀ utilizando GraphPad Prism 6.

11.2 Resultados

20 [00347] MORAb-109 (DAR2 y DAR6) mostró citotoxicidad específica en líneas celulares positivas para MSLN (Tabla 32). BAY 94-9343, por el contrario, demostró la destrucción de líneas celulares positivas para MSLN y negativas para MSLN.

25 **Tabla 32. Comparación de actividad *in vitro* en líneas celulares MSLN⁺ y MSLN⁻**

Potencia basada en células <i>in vitro</i> , CI50, nM						
	OVCAR3-A1	NCI-H1568/MSLN	NCI-H292	BxPC3	A431	SKOV3
MORAb109_DAR2	0.01	2.17	>300	88.24	109.30	213.80
MORAb109_DAR6	0.02	1.09	4.80	2.66	20.12	21.77
Eribulina	0.02	0.14	0.11	0.13	0.18	0.14
BAY 94-9343	0.41	0.15	3.07	2.53	5.31	0.81
DM4	0.10	0.57	0.24	0.57	0.71	0.28
anetumab	>100	>100	>300	>300	>300	>300
% de destrucción máx.						
MORAb109_DAR2	98.39	73.49	58.22	90.62	84.97	58.41
MORAb109_DAR6	98.47	77.89	75.34	94.63	90.76	72.79
Eribulina	99.31	74.39	85.37	97.28	93.04	72.82
BAY 94-9343	100.00	75.10	84.15	97.33	96.82	74.99
DM4	100.00	77.49	92.40	97.98	92.52	81.89
anetumab	19.80	5.50	15.15	25.73	18.58	31.55
Expresión de MSLN (IFM)	220.0	4474.00	108.6	15.59	5.6	20

EJEMPLO 12: Comparación de MORAb-109 con BAY 94-9343 -

Especificidad

12.1 Métodos

[00348] Citotoxicidad: Las células se subcultivaron y sembraron a 5,000 células/pocillo en medio de crecimiento completo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante una noche (16 horas). Los reactivos de prueba se diluyeron en serie 1:3 en placas de dilución de pocillos profundos de 2 ml, comenzando a 200 nM (10 diluciones en total). Se añadieron las muestras diluidas (100 µl) a las placas de células (concentración inicial de las muestras de prueba a 100 nM). Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 5 días adicionales. A continuación, se descartó el medio y las placas se lavaron una vez con 200 µl de DPBS, se tiñeron con 50 µl de solución de cristal violeta al 0.2 % a temperatura ambiente durante 15 min y después se lavaron abundantemente con agua del grifo. Las placas se secaron al aire y se disolvió cristal

violeta con 200 µl de solución de SDS al 1 %. Las placas se leyeron a 570 nm. Los datos se analizaron en cuanto a la determinación de la CI₅₀ utilizando GraphPad Prism 6.

12.2 Resultados

5 **[00349]** Los ensayos de citotoxicidad con anticuerpos no conjugados demostraron la destrucción específica de células que expresan mesotelina por MORAb-109 (DAR2) (FIG. 25A), pero no BAY 94-9343 (FIG. 25B). Sin quedar ligado a teoría alguna, la falta de competencia por parte del anticuerpo no conjugado observada para BAY 94-9343 sugiere la liberación de la carga útil, lo que puede conducir a la destrucción incluso cuando la unión del anticuerpo está bloqueada por un competidor no conjugado. Esta liberación de carga útil es congruente con los niveles relativamente altos de citotoxicidad observados para BAY 94-9343 en líneas celulares negativas para mesotelina (Tabla 32). La liberación de carga útil también se observa directamente en la FIG. 27 (comparación de estabilidad en plasma).

EJEMPLO 13: Comparación de MORAb-109 con BAY 94-9343 -

20 **Actividad de ADCC**

13.1 Métodos

[00350] Las células CHO que expresan MSLN se descongelaron y se sembraron 1,000 células/pocillo (25 µl) en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos en RPMI completo-SFB con IgG ultrabaja al 4 %. Los reactivos de la prueba (anticuerpo 345A12, MORAb-109 (DAR2) y BAY 94-9343) se diluyeron en serie a 1:2.5 a partir de 20 µg/ml en RPMI completo con SFB con IgG ultrabaja al 4 % y después se transfirieron (25 µl) a la placa de células, y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 60 min. Se descongelaron 6,000 células efectoras Jurkat (Promega) y se añadieron (25 µl) a

la placa de células, y la placa se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 18-22 horas.

[00351] El reactivo de ensayo de luciferasa se descongeló en oscuridad. Se añadieron 75 µl de reactivo de ensayo de luciferasa a cada pocillo, las placas se agitaron durante 30 segundos en un agitador de placas. Las placas se leyeron en un luminómetro después de 5 min de incubación.

13.2 Resultados

[00352] MORAb-109 (DAR2) y 345A12 HC15 LC4 tenían una actividad de ADCC similar (FIG. 26A y Tabla 33), mientras que BAY 94-9343 tenía una actividad de ADCC más débil que anetumab (FIG. 26B y Tabla 34).

Tabla 33. Actividad de ADCC - MORAb-109 y 345A12 HC15 LC4

345A12	MORAb-109
100 %	96.9 %

Tabla 34. Actividad de ADCC - BAY 94-9343 y anetumab

anetumab	BAY 94-9343
100 %	65.06 %

EJEMPLO 14: Estabilidad de MORAb-109 y BAY 94-9343 en matriz

14.1 Métodos

[00353] Los ADC anti-MSLN se prepararon a 0.1 mg/ml en plasma humano o de ratón, las muestras se incubaron a 37 °C durante 0, 24, 48, 72, 96 y 240 horas, después se transfirieron a -80 °C para su almacenamiento cuando se alcanzaron los puntos de tiempo. Todas las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se diluyeron 1:100 para la prueba. Se desarrolló un ensayo de estabilidad

sensible a la DAR en formato de sándwich escalonado en Gyrolab. El ensayo utilizó mesotelina biotinilada para la captura después del bloqueo y la unión de la muestra, y anti-eribulina Fab 5E4 Alexa Fluor 647 o anti-DM4 Alexa Fluor 647 (Levena Biopharma) para la detección. La curva patrón y los controles de calidad se prepararon con MORAb-109 y BAY 94-9343.

14.2 Resultados

[00354] MORAb-109 (DAR2) fue más estable que BAY 94-9343 tanto en plasma humano como de ratón (FIG. 27).

EJEMPLO 15: Eficacia antitumoral de MORAb-109 y BAY 94-9343 en el modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano (NCI-N87)

15.1 Métodos

15.1.1 Generación de BAY 94-9343

[00355] BAY 94-9343 es un ADC que comprende anetumab conjugado con el inhibidor de tubulina maitansinoide DM4 a través de un enlazador que contiene disulfuro (un enlazador SPDB reducible [N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato]). Las secuencias de anetumab se obtuvieron de la base de datos Beacon (Hanson-Wade). Las secuencias de los anticuerpos (Tabla 30) se generaron a partir de oligonucleótidos superpuestos, se amplificaron por PCR, se clonaron en plásmidos de expresión y se confirmaron las secuencias. Se generaron grupos estables en células 293F y las células se cultivaron hasta una viabilidad <30 %. El anetumab se purificó del medio condicionado mediante cromatografía de afinidad con proteína A. BAY 94-9343 se generó mediante conjugación reactiva de lisina con SPDB-DM4 (Levena BioPharma) para lograr una DAR de 3.7. La carga útil

no conjugada se eliminó mediante cromatografía de desalinización.

15.1.2 Eficacia *in vivo*

[00356] Animales: Se aclimataron durante 5-7 días antes de la inoculación ratones lampiños NCr hembra (Taconic), de 5 semanas de vida en el momento de su llegada. Los animales se instalaron a razón de 3-5 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad. Los animales se etiquetaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio.

[00357] Cultivo de células: Se descongelaron células NCI-N87 criopreservadas y se cultivaron en medio que contenía los complementos necesarios. Las células se subcultivaron en medio completo durante 2 pases antes de usarlas para la inoculación *in vivo*.

[00358] Implantación de tumores, proceso de inclusión en el estudio y tratamiento: La suspensión celular en PBS se mezcló con Matrigel enfriado en hielo a 1:1 (vol:vol) hasta una concentración final de 1.0×10^8 células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l/ratón de la mezcla. Los ratones se controlaron en cuanto a su bienestar clínico con mediciones del peso corporal y los tumores con un compás calibrador digital, 3 veces por semana, comenzando el día 3 posimplantación.

[00359] Medición y tratamiento de tumores: El volumen tumoral (VT) (mm^3) se calculó utilizando la fórmula: $A \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} \times D \text{ (mm)} \times \pi/6$. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 en promedio, los animales se aleatorizaron a 5 por grupo. El tratamiento se proporcionó por vía intravenosa en un volumen de 200 μ l del artículo de

prueba. Al final del estudio, se midió y registró el peso corporal terminal.

[00360] Análisis estadístico: Se realizaron análisis estadísticos descriptivos sobre los datos de volumen tumoral y peso corporal. Los volúmenes tumorales de los animales de cada grupo de tratamiento se compararon con el grupo de control mediante el uso del ANOVA bidireccional de medidas repetidas, seguido de la prueba posterior de Bonferroni. Adicionalmente, se realizó la comparación del crecimiento tumoral de animales dentro de cada grupo con el mismo análisis estadístico.

15.2 Resultados

[00361] MORAb-109 (DAR2) y BAY 94-9343 demostraron una eficacia similar en ratones portadores de tumor de NCI-N87 (FIG. 28A). No se observó pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos (FIG. 28B).

EJEMPLO 16: Eficacia antitumoral de MORAb-109 y BAY 94-9343 en el modelo de xenoinjerto de mesotelioma humano (HAY)

16.1 Métodos

[00362] Animales: Se aclimataron durante 5-7 días antes de la inoculación ratones NOD.CB17-IDCG (Jackson Laboratory), de 5 semanas de vida en el momento de su llegada. Los animales se instalaron a razón de 3-5 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad. Los animales se etiquetaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio.

[00363] Cultivo de células: Se descongelaron células HAY criopreservadas y se cultivaron en medio que contenía los complementos necesarios. Las células se subcultivaron en

medio completo durante 2 pases antes de usarlas para la inoculación *in vivo*.

[00364] Implantación de tumores, proceso de inclusión en el estudio y tratamiento: La suspensión celular en PBS se mezcló con Matrigel enfriado en hielo a 1:1 (vol:vol) hasta una concentración final de 5.0×10^7 células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l/ratón de la mezcla. Los ratones se controlaron en cuanto a su bienestar clínico con mediciones del peso corporal y los tumores con un compás calibrador digital, 3 veces por semana, comenzando el día 3 posimplantación.

[00365] Medición y tratamiento de tumores: El volumen tumoral (VT) (mm^3) se calculó utilizando la fórmula: $A \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} \times D \text{ (mm)} \times \pi/6$. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 en promedio, los animales se aleatorizaron a 5 por grupo. El tratamiento se proporcionó por vía intravenosa en un volumen de 200 μ l del artículo de prueba. Al final del estudio, se midió y registró el peso corporal terminal.

[00366] Análisis estadístico: Se realizaron análisis estadísticos descriptivos sobre los datos de volumen tumoral y peso corporal. Los volúmenes tumorales de los animales de cada grupo de tratamiento se compararon con el grupo de control mediante el uso del ANOVA bidireccional de medidas repetidas, seguido de la prueba posterior de Bonferroni. Adicionalmente, se realizó la comparación del crecimiento tumoral de animales dentro de cada grupo con el mismo análisis estadístico.

16.2 Resultados

[00367] MORAb-109 (DAR2) y BAY 94-9343 demostraron una eficacia similar en ratones portadores de tumor de HAY

(FIG. 29A). No se observó pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos (FIG. 29B).

EJEMPLO 17: Eficacia antitumoral de MORAb-109 y BAY 94-9343 en el modelo de PDX de mesotelioma humano (Meso7212)

5 **17.1 Métodos**

[00368] Animales: Se aclimataron ratones hembra NMRI nu/nu (Janvier Labs), de 5 a 6 semanas de edad en el momento de su llegada, durante al menos 4 días antes de la inoculación. Los animales se instalaron a razón de 3-5
10 ratones por jaula con ventilación y disponían de gránulos de pienso esterilizados y bebederos a voluntad. Los animales se marcaron en las orejas y se pesaron antes del inicio del estudio

[00369] Xenotrasplante: El día 0, se extrajeron
15 tumores Meso 7212 de cinco ratones donantes en condiciones estériles. El tejido tumoral se cortó en fragmentos de 2 x 2 mm y se colocó en una placa Petri estéril cubierta con solución salina al 0.9 %. En paralelo, los animales receptores se trataron con analgésico por vía subcutánea con
20 Metacam® (2 mg/kg) y después se anestesiaron mediante una única inyección intravenosa (0.15 ml/ratón) con Etomidat-Lipuro® (12 mg/kg). Se realizó una incisión vertical superficial en la piel de 5-8 mm en el costado izquierdo. Se insertó la punta de una tijera quirúrgica en la incisión,
25 directamente sobre el costado y se utilizó para formar una bolsa en el espacio subcutáneo. Se implantó un fragmento de tumor por ratón en el bolsillo utilizando pinzas quirúrgicas. Por último, se cerró la incisión con una grapa metálica y el animal se colocó en una jaula limpia.

30 [00370] Procedimiento experimental: Después del xenotrasplante, el injerto y la propagación del tumor en los

ratones se controlaron por palpación al menos dos veces por semana. Cuando el tumor era palpable, se realizaron las mediciones de los diámetros tumorales con un compás calibrador digital (Mitutoyo).

5 **[00371]** Antes de iniciar el tratamiento, los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales de acuerdo con el volumen de su tumor (criterios de inclusión para el volumen tumoral, 0.1-0.3 cm³). Desde el primer día de tratamiento en adelante, los volúmenes tumorales y los
10 pesos corporales se registraron dos veces por semana. El bienestar animal se controló dos veces al día.

[00372] Tratamiento: Todos los agentes se administraron por vía intravenosa como una dosis única el día de la aleatorización. Los animales del grupo de control
15 se trataron con DPBS de la misma manera.

[00373] Análisis estadístico: Se realizaron análisis estadísticos descriptivos sobre los datos de volumen tumoral y peso corporal. Los volúmenes tumorales de los animales de cada grupo de tratamiento se compararon con el grupo de
20 control mediante el uso del ANOVA bidireccional de medidas repetidas, seguido de la prueba posterior de Bonferroni. Adicionalmente, también se realizó la comparación del crecimiento tumoral de animales dentro de cada grupo con el mismo análisis estadístico.

25

17.2 Resultados

[00374] MORAb-109 (DAR2) y BAY 94-9343 demostraron regresión tumoral en ratones portadores de tumor de Meso7212 (FIG. 30A). No se observó pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos (FIG. 30B).

EJEMPLO 18: Eficacia antitumoral de MORAb-109 y BAY 94-9343 en el modelo de PDX de CPNM humano (LXFA-586)

18.1 Métodos

[00375] Animales: Ratones hembra NMRI nu/nu, de 4 a 6 semanas de edad.

[00376] Xenotrasplante: LXFA-586 estableció un tumor en crecimiento (T2N1M0) de un paciente humano con adenocarcinoma de pulmón no microcítico primario.

[00377] Procedimiento experimental: Los animales se controlaron hasta que los implantes tumorales alcanzaron los criterios de volumen de estudio de 50-250 mm³ (por ejemplo, 80-200 mm³) en un número suficiente de animales. Los ratones se asignaron a grupos con el objetivo de que la mediana y la media de los volúmenes tumorales fueran comparables. El proceso de asignación a grupos (inclusión, aleatorización estratificada) también puede denominarse aleatorización. El día de la aleatorización se designó como el día 0 del experimento.

[00378] Tratamiento: La eficacia se evaluó en 4 grupos de 6 a 7 ratones cada uno:

- En el grupo 1, el vehículo se dosificó a una dosis única de 5 ml/kg, i.v., el día 1.
- En el grupo 2, BAY 94-9343 (DAR ~ 4) se dosificó a una dosis única de 25 mg/kg i.v. el día 1.

- En el grupo 3, MORAb-109 (DAR2) se dosificó a una dosis única de 25 mg/kg i.v. el día 1.
- En el grupo 4, la eribulina se dosificó a una dosis única de 3.2 mg/kg, i.v., el día 1.

5 **[00379]** Se midieron los tumores y se pesaron los ratones dos veces por semana durante el período experimental. El primer día de dosificación fue el día 1, un día después de la aleatorización (día 0).

18.2 Resultados

10 **[00380]** MORAb-109 (DAR2) demostró una sólida eficacia antitumoral (T/C mínima, 1.8 % el día 41) a 25 mg/kg en el modelo de PDX de CPNM LXFA-586 (FIG. 31A) y su Tc no se alcanzó durante el estudio. MORAb-109 proporcionado en dosis única también fue bien tolerado sin pérdida de peso corporal
15 por los ratones portadores de tumores LXFA-586 (FIG. 31B).

[00381] BAY 94-9343 (DAR ~ 4) demostró una eficacia antitumoral sólida similar a MORAb-109 a 25 mg/kg en el modelo de PDX de CPNM LXFA-586 (FIG. 31A) y su Tc no se alcanzó durante el estudio. Sin embargo, la cantidad molar
20 de carga útil de DM4 en BAY 94-9343 es aproximadamente el doble de la cantidad de carga útil de eribulina en MORAb-109.

[00382] La eribulina proporcionada a una dosis única de 3.2 mg/kg (dosificación de DMT de ratón o 32 veces mayor
25 que la cantidad molar de eribulina en MORAb-109 cuando se administra a 10 mg/kg) por vía intravenosa fue bien tolerada por los ratones portadores de tumor de LXFA-586, mostró eficacia antitumoral (T/C mínimo, 14.8 % en el día 21). Sin embargo, la eribulina indujo una pérdida de peso corporal
30

leve y transitoria después de la administración (FIG. 31A y la FIG. 31B).

EJEMPLO 19: Eficacia antitumoral de MORAb-109 y BAY 94-9343 en el modelo de PDX de CPNM humano (LXFL-529)

5 **19.1 Métodos**

[00383] Animales: Ratones hembra NMRI nu/nu, de 4 a 6 semanas de edad.

[00384] Xenotrasplante: LXFL-529 estableció un tumor en crecimiento (T3N1M0) de un paciente humano con
10 adenocarcinoma de pulmón no microcítico primario.

[00385] Procedimiento experimental: Los animales se controlaron hasta que los implantes tumorales alcanzaron los criterios de volumen de estudio de 50-250 mm³ (por ejemplo, 80-200 mm³) en un número suficiente de animales. Los ratones
15 se asignaron a grupos con el objetivo de que la mediana y la media de los volúmenes tumorales fueran comparables. El proceso de asignación a grupos (inclusión, aleatorización estratificada) también puede denominarse aleatorización. El día de la aleatorización se designó como el día 0 del
20 experimento.

[00386] Tratamiento: La eficacia se evaluó en 6 grupos de 6 a 7 ratones cada uno:

- En el grupo 1, el vehículo se dosificó a una dosis única de 5 ml/kg, i.v., el día 1.
- 25 • En el grupo 2, BAY 94-9343 (DAR ~ 4) se dosificó a una dosis única de 12.5 mg/kg i.v. el día 1.
- En el grupo 3, la eribulina se dosificó a una dosis única de 3.2 mg/kg, i.v., el día 1.
- 30 • En el grupo 4, MORAb-109 (DAR2) se dosificó a una dosis única de 25 mg/kg i.v. el día 1.

- En el grupo 5, MORAb-109 (DAR2) se dosificó a una dosis única de 12.5 mg/kg i.v. el día 1.

- En el grupo 6, MORAb-109 (DAR2) se dosificó en dosis de 12.5 mg/kg, i.v., los días 1, 8 y 16.

5 **[00387]** Se midieron los tumores y se pesaron los ratones dos veces por semana durante el período experimental. El primer día de dosificación fue el día 1, un día después de la aleatorización (día 0).

19.2 Resultados

10 **[00388]** MORAb-109 (DAR2) demostró una sólida eficacia antitumoral a 12.5 y 25 mg/kg en el modelo de PDX de CPNM LXFL-529 (FIG. 32A). MORAb-109 proporcionado en dosis única también fue bien tolerado sin pérdida de peso corporal por los ratones portadores de tumores LXFL-529 (FIG. 32B).

15 **[00389]** BAY 94-9343 (DAR ~ 4), sin embargo, a 12.5 mg/kg (la cantidad molar equivalente de carga útil de DM4 como la cantidad de carga útil de eribulina en MORAb-109 a 25 mg/kg) no demostró eficacia antitumoral (FIG. 32A).

20 **[00390]** La eribulina proporcionada en una dosis única de 3.2 mg/kg (dosificación de DMT en ratón) por vía intravenosa fue bien tolerada por los ratones portadores de tumores LXFL-529 y mostró eficacia antitumoral. Sin embargo, la eribulina indujo una pérdida de peso corporal leve y transitoria después de la administración (FIG. 32A y la FIG. 25 32B).

30 **[00391]** Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.