

ANTICUERPOS ANTI-MESOTELINA

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a mesotelina (MSLN).

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Carcinomas como los mesoteliomas, los adenocarcinomas pancreáticos, los cánceres de ovario y los adenocarcinomas pulmonares son altamente destructivos y muy difíciles de tratar. Por ejemplo, el adenocarcinoma ductal pancreático representa el 90 % de todos los tumores pancreáticos y su incidencia va en aumento, al tiempo que tiene muy mal pronóstico. La falta
10 de pruebas diagnósticas específicas y las escasas posibilidades de tratamiento representan un grave problema sanitario.

La mesotelina (MSLN) es una molécula de la superficie celular que se expresa como una proteína precursora de 71 kD que se procesa posteriormente en una glicoproteína de 40 kD anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés) en la superficie celular. La
15 MSLN muestra una expresión muy limitada y baja en los tejidos normales. Se expresa en las células mesoteliales que recubren la pleura, el pericardio y el peritoneo, donde parece desempeñar un papel en la adhesión celular (Chang *et al.* (1996) PNAS 93:136-140). También se ha propuesto que la MSLN soluble escindida desempeña un papel en la estimulación de los megacariocitos, pero un knockout en ratones no mostró ningún defecto en el desarrollo,
20 por lo que su papel biológico no está claro (Yamaguchi *et al.* (1994) 269(2):805-8; Bera *et al.* (2000) 20(8):2902-6).

En cambio, MSLN se expresa en gran medida en varios tipos de cáncer humano, incluidos prácticamente todos los mesoteliomas y adenocarcinomas pancreáticos, y aproximadamente el 70 % de los cánceres de ovario y el 50 % de los adenocarcinomas de
25 pulmón (Hassan y Ho (2008) Eur. J. Cancer 44:46-53; Miettinen y Sarlomo-Rikala (2003) Am. J. Surg. Pathol. 27:150-8; Ordonez (2003) Am. J. Surg. Pathol. 27:1418-1428; Ho *et al.* (2007) Clin. Cancer Res. 13:1571-5). Su alto nivel de expresión convierte a MSLN en un candidato atractivo para la terapia dirigida, ya que desempeña un papel importante en la proliferación y la invasión que promueven los tumores (Servais *et al.* (2012) Clin. Cancer Res. 18(9):2478-
30 2489).

MSLN interactúa con MUC16 mediando la adhesión celular, que desempeña un papel importante en la implantación peritoneal de células de cáncer de ovario y aumenta la motilidad e invasión de células de carcinoma pancreático (Rump *et al.* (2004) J Biol Chem. 279(10):9190-8; Gubbels *et al.* (2006) Mol Cancer 5(1):50; Coehlo *et al.* Expert Rev Anticancer Ther. 18(2):177-186; Chen *et al.* (2013) Sci Rep. 3:1870). En particular, los tumores de páncreas a menudo han progresado demasiado antes de que los pacientes sientan síntomas de la enfermedad y el tiempo medio de supervivencia es corto (a menudo menos de un año). Este pronóstico es malo porque a menudo el tumor no puede extirparse quirúrgicamente (por completo) y ya ha hecho metástasis (a menudo de forma indetectable). La quimioterapia tampoco conlleva una mejora sustancial del tiempo de supervivencia o curación. A pesar de varios intentos, todavía no existe una inmunoterapia exitosa. Incluso el anticuerpo monoclonal más conocido contra la mesotelina (Amatuximab), que se une a la forma soluble de MSLN, no es particularmente exitoso (Baldo y Cecco (2017) Onco. Targets Ther. 10:5337-5353; Nicolaides *et al.* (2018) Cancer Biology & Therapy 19(7):622-630). Desgraciadamente, el desprendimiento de mesotelina por el tumor causa una serie de problemas, aunque puede utilizarse como biomarcador de la enfermedad (Hassan *et al.* (2006) Clin. Cancer Res. 12:447-453). El desprendimiento causa problemas para la obtención de imágenes de los tumores y la posible radioterapia. El desprendimiento de MSLN en el torrente sanguíneo provoca un fondo elevado para las imágenes basadas en anticuerpos radiomarcados y es tóxico porque un anticuerpo radiomarcado se une a la mesotelina desprendida en todo el cuerpo. Esto requiere la administración de dosis elevadas y, por tanto, tóxicas de anticuerpos antimesotelina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la mesotelina y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como usos de los mismos, ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, vectores que comprenden los ácidos nucleicos y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos o los vectores. También se divulgan composiciones farmacéuticas y conjugados que comprenden los anticuerpos, y métodos terapéuticos mediante la administración de los anticuerpos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de

cadena pesada (VH), y en donde

(1) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27;

5 (2) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28;

10 (3) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27;

(4) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29;

15 (5) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30;

(6) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31;

20 (7) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32;

25 (8) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33;

(9) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29;

(10) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de

aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 63, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67;

(11) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 64, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que
5 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67;

(12) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67;

(13) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que
10 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 68;

(14) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 63, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 68;

(15) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 66, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que
15 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67;

(16) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 64, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que
20 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 69;

(17) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 66, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 69;

(18) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 63, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que
25 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 69; o

(19) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 69.

En algunas modalidades, los LCDR 1-3 y los HCDR 1-3 se definen mediante el sistema de definición/numeración EU Kabat. En algunas modalidades, los LCDR 1-3 y los HCDR 1-3 se definen mediante el sistema de definición/numeración de Chothia. En algunas modalidades, los LCDR 1-3 y los HCDR 1-3 se definen mediante el sistema de definición/numeración AbM.

- 5 En algunas modalidades preferidas, los LCDR 1-3 y los HCDR 1-3 se definen mediante el sistema de numeración combinada de Kabat y Chothia.

En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o a un fragmento de unión a antígeno de la misma, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de
10 cadena pesada (VH), y en donde

(1) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 13 respectivamente;

- 15 (2) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 15, 16, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 18 respectivamente;

(3) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos
20 establecidas en SEQ ID NOs: 15, 17, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 13 respectivamente;

(4) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos
25 establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 19 respectivamente;

(5) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos
30 establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 20 respectivamente;

(6) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos

establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 21 respectivamente;

5 (7) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 22 respectivamente;

10 (8) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 23 respectivamente;

15 (9) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 15, 16, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 19 respectivamente;

(10) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 45, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 52, 54, 56 respectivamente;

20 (11) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 52, 54, 56 respectivamente;

25 (12) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 59, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 52, 54, 56 respectivamente;

30 (13) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 59, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 61, 54, 56 respectivamente;

(14) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 45, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 61, 54, 56 respectivamente;

5 (15) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 60, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 52, 54, 56 respectivamente;

10 (16) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 62, 54, 56 respectivamente;

15 (17) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 60, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 62, 54, 56 respectivamente;

20 (18) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 45, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 62, 54, 56 respectivamente; o

(19) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 59, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 62, 54, 56 respectivamente.

25 En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), y en donde:

30 (1) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia

de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27;

5 (2) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 28;

10 (3) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 26, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
15 SEQ ID NO: 27;

(4) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
20 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29;

(5) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia
25 de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 30;

(6) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %
30 o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con

SEQ ID NO: 31;

5 (7) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 32;

10 (8) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 33;

15 (9) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29;

20 (10) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 63, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
25 SEQ ID NO: 67;

(11) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 64, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
30 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 67;

(12) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 65, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 67;

(13) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 65, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 68;

(14) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 63, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 68;

(15) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 66, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 67;

(16) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 64, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 69;

(17) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %

o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 66, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 69;

5 (18) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 63, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
10 SEQ ID NO: 69; o

 (19) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 65, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
15 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 69.

 En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC, por sus siglas en inglés) y una cadena ligera
20 (LC, por sus siglas en inglés), y en donde:

 (1) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
25 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 37;

 (2) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 35, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
30 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38;

(3) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 36, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 37;

(4) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 39;

(5) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 40;

(6) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41;

(7) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 42;

(8) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %

o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 43;

5 (9) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 35, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
10 SEQ ID NO: 39;

 (10) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 70, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
15 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 74;

 (11) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 71, y la LC comprende una secuencia
20 de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 74;

 (12) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %
25 o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 72, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 74;

 (13) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al
30 menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 72, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos

un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 75;

5 (14) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 70, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 75;

10 (15) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 73, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 74;

15 (16) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 71, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
20 SEQ ID NO: 76;

(17) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 73, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
25 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 76;

(18) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 70, y la LC comprende una secuencia
30 de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 76; o

(19) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 72, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 76.

En algunas modalidades preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a mesotelina unida a membrana. En algunas modalidades preferidas, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une a la mesotelina unida a la membrana con una mayor afinidad en comparación con la afinidad de su unión a la mesotelina soluble. En algunas modalidades preferidas, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une a mesotelina unida a membrana con una afinidad que es al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces de la afinidad de su unión a mesotelina soluble. En algunas modalidades, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo no se une sustancialmente a MSLN soluble. En algunas modalidades, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a MSLN soluble.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

En algunas modalidades, el anticuerpo es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. En modalidades preferidas, el anticuerpo es de un subtipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fd', Fv, scFv, ds-scFv y dAb.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.

En algunas modalidades, el anticuerpo es monovalente, bivalente o multivalente.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está unido a una etiqueta fluorescente, radiomarcador o agente citotóxico.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico, que

comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto de la invención y una segunda región de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor, un antígeno de células inmunitarias o una molécula de punto de control inmunitario.

5 En el tercer aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto de la invención o el anticuerpo biespecífico del segundo aspecto de la invención.

10 En el cuarto aspecto, la invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico del tercer aspecto de la invención.

En el quinto aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico del tercer aspecto de la invención o el vector del cuarto aspecto de la invención.

15 En el sexto aspecto, la invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés), en donde el ADC comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto de la invención o el anticuerpo biespecífico del segundo aspecto de la invención.

20 En el séptimo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto de la invención, o el anticuerpo biespecífico del segundo aspecto de la invención, o el ácido nucleico del tercer aspecto de la invención, o el vector del cuarto aspecto de la invención, o la célula huésped del quinto aspecto de la invención, o el conjugado anticuerpo-fármaco del sexto aspecto de la invención; y opcionalmente (ii) un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 En algunas modalidades, la composición comprende además un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un ARNpi, un oligonucleótido antisentido, un polipéptido y un fármaco de molécula pequeña.

30 En el octavo aspecto, la invención proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo biespecífico, el ácido nucleico, el vector, la célula huésped, el conjugado anticuerpo-fármaco, o la composición farmacéutica de la invención.

En algunas modalidades específicas, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) y cáncer de ovario.

- 5 En algunas modalidades, el método comprende además la administración al sujeto de un segundo agente terapéutico. Preferiblemente, el segundo agente terapéutico se selecciona de un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un ARNpi, un oligonucleótido antisentido, un polipéptido y un fármaco de molécula pequeña.

- 10 En un noveno aspecto, la invención proporciona el uso del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo biespecífico, el ácido nucleico, el vector, la célula huésped, el conjugado anticuerpo-fármaco, o la composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer en un sujeto.

- 15 En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) y cáncer de ovario.

- 20 En algunas modalidades, el medicamento comprende además un segundo agente terapéutico, opcionalmente el segundo agente terapéutico se selecciona entre un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un ARNpi, un oligonucleótido antisentido, un polipéptido y un fármaco de molécula pequeña.

En algunas modalidades, el medicamento se administra en combinación con un segundo agente terapéutico, opcionalmente el segundo agente terapéutico se selecciona entre un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un ARNpi, un oligonucleótido antisentido, un polipéptido y un fármaco de molécula pequeña.

- 25 En un décimo aspecto, la invención proporciona el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo biespecífico, el ácido nucleico, el vector, la célula huésped, el conjugado anticuerpo-fármaco, o la composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto.

- 30 En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo,

cáncer de mama triple negativo) y cáncer de ovario.

En algunas modalidades, se administra además al sujeto un segundo agente terapéutico, opcionalmente seleccionado entre un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un ARNpi, un oligonucleótido antisentido, un polipéptido y un fármaco de molécula pequeña.

5 En un undécimo aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un cáncer mesotelina-positivo en un sujeto que comprende:

(a) obtener de una muestra biológica del sujeto,

(b) poner en contacto la muestra con el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, y

10 (c) detectar la unión del anticuerpo a la muestra,

en donde un aumento de la unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a la muestra en comparación con la unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a una muestra de control identifica al sujeto como portador de un cáncer mesotelina-positivo.

15 En un duodécimo aspecto, la invención proporciona un método para obtener imágenes de un cáncer mesotelina-positivo en un sujeto que comprende:

(a) administrar al sujeto el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, en donde el anticuerpo está conjugado con un marcador detectable, y

(b) detectar la presencia del marcador.

20 En algunas modalidades preferidas, (a) el marcador detectable es ^{111}In , y preferentemente la detección del marcador se realiza mediante tomografía computarizada por emisión de fotón único, o bien

(b) el marcador detectable es ^{89}Zr , y preferentemente la detección del marcador se realiza mediante tomografía por emisión de positrones.

25 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Esquema de generación de anticuerpos anti-mesotelina. Los ratones transgénicos Harbour H2L2 se inmunizan mediante la inyección repetida de la proteína mesotelina

recombinante, seguida de la generación de hibridomas y el cribado de clones para identificar anticuerpos tetraméricos (H2L2) específicos de MSLN.

FIG. 2. El flujo de trabajo de la estrategia y el proceso de cribado para el cribado de clonación de células B únicas.

5 **FIG. 3** Unión de los anticuerpos PR300159 y PR300186 a MSLN humana unida a membrana en la superficie de células CHOK1-humanas MSLN.

FIG. 4 Unión de los anticuerpos PR300159 y PR300186 a MSLN cynomolgus unidos a membrana en la superficie de células CHOK1-cyno MSLN.

10 **FIG. 5.** Unión de los anticuerpos PR300159 y PR300186 a MSLN humana unida a membrana y expresada endógenamente en la línea celular COV644.

FIG. 6. Unión de PR300186 y los anticuerpos de eliminación de PTM de PR300186 a la proteína MSLN humana.

FIG. 7. Unión de PR300186 y los anticuerpos de eliminación de PTM de PR300186 a la proteína cyno MSLN.

15 **FIG. 8.** Unión de PR300159 y del anticuerpo de eliminación de PTM de PR300159a células COV 644.

FIG. 9 Unión de PR300186 y los anticuerpos de eliminación de PTM de PR300186 a células COV 644.

20 **FIG. 10.** Internalización de PR300159 y los anticuerpos de eliminación de PTM de PR300159 en células COV644.

FIG. 11. Internalización de PR300186 y los anticuerpos de eliminación de PTM de PR300186 en células COV644.

FIG. 12 Unión del anticuerpo PR300159 a células COV644 en presencia o ausencia de MSLN soluble (sMSLN): (A) sin sMSLN; (B) con 90 nM de sMSLN.

25 **FIG. 13** Unión del anticuerpo PR300186 a células COV644 en presencia o ausencia de MSLN soluble (sMSLN): (A) sin sMSLN; (B) con 90 nM de sMSLN.

FIG. 14. Unión del anticuerpo PR300159-8 a células COV644 en presencia o ausencia

de MSLN soluble (sMSLN).

FIG. 15. Unión del anticuerpo PR300186-10 a células COV644 en presencia o ausencia de MSLN soluble (sMSLN).

SECUENCIAS

- 5 Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera, la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera (VL), la región variable de la cadena pesada (VH), las CDR y las FWR de la cadena ligera y la cadena pesada se indican en las Tablas 1 a 4 siguientes.

Tabla 1. Secuencias de la cadena pesada y de la cadena ligera de los anticuerpos

Clon	Cadena pesada	SEQ ID NO	Cadena ligera	SEQ ID NO
PR30 0159	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTP	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIKRWLAAYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLPDDFATF YCQQYNYSYRTFGQGTKEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	37

	PVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK			
PR30 0159- 1	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDAMNW VRQAPGKGLEWVAVIWNE GSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	35	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYSSYSRTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	38
PR30 0159- 3	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDAMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND ASNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV	36	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYNSYSRTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD	37

	KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK		STYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
PR30 0159- 4	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYNAYSRTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	39

	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK			
PR30 0159- 5	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQISIRWLAWYQ QKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFT LTISNLQPDDFATFYCQ QYQSYSRTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYP PREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDISTY LSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKS FNRC	40
PR30 0159- 6	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQISIRWLAWYQ QKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFT LTISNLQPDDFATFYCQ QYNTYSRTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGT	41

	QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK		ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
PR30 0159- 7	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQGISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLPDDFATF YCQQYTSYSRTFGQGKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	42

	YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK			
PR30 0159- 8	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGLWPLDYWG QGTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYASYSRTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	43
PR30 0159- 9	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDAMNW VRQAPGKGLEWVAVIWNE GSNKYYADSVKGRFTISR	35	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF	39

	NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK		YCQQYNAYSRTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
PR30 0186	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSINNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE	70	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	74

	VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK			
PR30 0186- 2	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKS RVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	71	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	74
PR30 0186-	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR	72	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNSNLAWYQQKPGQ	74

3	QPPGKGLEWIGYIFYSGST QSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK		APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
PR30 0186- 4	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST QSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP	72	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVQSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	75

	KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK			
PR30 0186- 5	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSINNYWSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	70	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVQSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	75

PR30 0186- 6	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NANPSLKSRIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	73	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	74
PR30 0186- 7	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS	71	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNANLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	76

	NTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK			
PR30 0186- 8	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NANPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRW	73	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNANLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	76

	QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK			
PR30 0186- 9	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSINNYWSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	70	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNANLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	76
PR30 0186- 10	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSIQNYWSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST QSNPSLKSRIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH	72	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNANLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVY	76

	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPV DSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK		ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
--	--	--	----------------------------	--

Tabla 2. Secuencias de las regiones VH y VL de los anticuerpos

Clon	Región variable de la cadena pesada	SEQ ID NO	Región variable de la cadena ligera	SEQ ID NO
PR30 0159	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQISRWLAWYQQK PGKAPKLLIYKASSLESGV PSRFSGSGSGTEFTLTISN LQPDDFATFYCQQYNSYSR TFGQGTKVEIK	27
PR30 0159- 1	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDAMN WVRQAPGKGLEWVAVI WNEG SNKYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAV YYC CARDRGPLWPLDYWGQ GTLVTVSS	25	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQISRWLAWYQQK PGKAPKLLIYKASSLESGV PSRFSGSGSGTEFTLTISN LQPDDFATFYCQQYSSYSR TFGQGTKVEIK	28

PR30 0159- 3	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDAMNWW RQAPGKGLEWVAVIWDA SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDRGPLWPLDYWGQ GTLVTVSS	26	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYNSYSRTFGQGTKVEIK	27
PR30 0159- 4	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYNAYSRTFGQGTKVEIK	29
PR30 0159- 5	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYQSYSRTFGQGTKVEIK	30
PR30 0159- 6	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYNTYSRTFGQGTKVEIK	31
PR30 0159- 7	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYTSYSRTFGQGTKVEIK	32

PR30 0159- 8	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDGMNW VRQAPGKGLEWVAVIWND GSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGPLWPLDYWG QGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYASYSRTFGQGTKVEIK	33
PR30 0159- 9	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSDAMNWW RQAPGKGLEWVAVIWNEG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDRGPLWPLDYWGQ GTLVTVSS	25	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQISRWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPDDFATF YCQQYNAYSRTFGQGTKVEIK	29
PR30 0186	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSINYYWSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LTVSS	63	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	67
PR30 0186- 2	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYWSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LTVSS	64	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	67
PR30 0186- 3	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYWSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST QSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LTVSS	65	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	67

PR30 0186- 4	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST QSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LVTVSS	65	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVQSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	68
PR30 0186- 5	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LVTVSS	63	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVQSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	68
PR30 0186- 6	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NANPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LVTVSS	66	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	67
PR30 0186- 7	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LVTVSS	64	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNANLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	69
PR30 0186- 8	QVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSIQNYYSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NANPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LVTVSS	66	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNANLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	69

PR30 0186- 9	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSINNYWSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST NSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LVTVSS	63	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNANLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	69
PR30 0186- 10	QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCTVSGGSIQNYWSWVR QPPGKGLEWIGYIFYSGST QSNPSLKSRVIISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAR EVGRIAVAGWFFDLWGRGT LVTVSS	65	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNANLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDAVY YCQQYNNWPLTFGQGTRLEIK	69

Tabla 3. Secuencias del HCDR1-3 y HFWR1-4 de los anticuerpos (según el sistema combinado de Kabat y Chothia)

Ab	SEQ ID NO :	HFWR 1	SEQ ID NO :	HCDR 1	SEQ ID NO :	HFWR 2	SEQ ID NO :	HCDR 2	SEQ ID NO :	HFWR 3	SEQ ID NO :	HCDR 3	SEQ ID NO :	HFWR 4
PR 300 159	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL SCAA S	2	GFTF SSDG MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	4	VIWN DGSN KYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA EDTA VYYC AR	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS
PR 300 159 -1	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL	1 5	GFTF SSDA MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	1 6	VIWN EGSN KYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS

		SCAA S							EDTA VYYC AR					
PR 300 159 -3	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL SCAA S	1 5	GFTF SSDA MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	1 7	VIWN DASN KYYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA EDTA VYYC AR	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS
PR 300 159 -4	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL SCAA S	2	GFTF SSDG MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	4	VIWN DGSN KYYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA EDTA VYYC AR	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS
PR 300 159 -5	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL SCAA S	2	GFTF SSDG MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	4	VIWN DGSN KYYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA EDTA VYYC AR	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS
PR 300 159 -6	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL SCAA S	2	GFTF SSDG MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	4	VIWN DGSN KYYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA EDTA VYYC AR	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS
PR 300 159 -7	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL SCAA S	2	GFTF SSDG MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	4	VIWN DGSN KYYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA EDTA VYYC AR	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS

PR 300 159 -8	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL SCAA S	2	GFTF SSDG MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	4	VIWN DGSN KYYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA EDTA VYYC AR	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS
PR 300 159 -9	1	QVQL VESG GGVV QPGR SLRL SCAA S	1 5	GFTF SSDA MN	3	WVRQ APGK GLEW VA	1 6	VIWN EGSN KYYA DSVK G	5	RFTIS RDNS KNTLY LQMN SLRA EDTA VYYC AR	6	DRGP LWPL DY	7	WGQG TLVTV SS
PR 300 186	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TLSLT CTVS	4 5	GGSI NNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	4 7	YIFYS GSTN SNPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA VYYC AR	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVTV SS
PR 300 186 -2	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TLSLT CTVS	5 8	GGSI QNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	4 7	YIFYS GSTN SNPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA VYYC AR	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVTV SS
PR 300 186 -3	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TLSLT CTVS	5 8	GGSI QNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	5 9	YIFYS GSTQ SNPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA VYYC AR	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVTV SS
PR 300 186	4 4	QVQL QESG PGLV	5 8	GGSI QNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI	5 9	YIFYS GSTQ SNPS	4 8	RVIIS VDTS KNQF	4 9	EVGRI AVAG WFFD	5 0	WGRG TLVTV SS

-4		KPSE TSLT CTVS				G		LKS		SLKLS SVTA ADTA VYYC AR		L		
PR 300 186 -5	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TSLT CTVS	4 5	GGSI NNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	4 7	YIFY GSTN SNPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA VYYC AR	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVTV SS
PR 300 186 -6	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TSLT CTVS	5 8	GGSI QNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	6 0	YIFY GSTN ANPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA VYYC AR	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVTV SS
PR 300 186 -7	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TSLT CTVS	5 8	GGSI QNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	4 7	YIFY GSTN SNPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA VYYC AR	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVTV SS
PR 300 186 -8	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TSLT CTVS	5 8	GGSI QNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	6 0	YIFY GSTN ANPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA VYYC AR	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVTV SS
PR 300 186 -9	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TSLT CTVS	4 5	GGSI NNYY WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	4 7	YIFY GSTN SNPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVTV SS

										VYYC AR				
PR 300 186 -10	4 4	QVQL QESG PGLV KPSE TSLT CTVS	5 8	GGSI QNYW WS	4 6	WVRQ PPGK GLEWI G	5 9	YIFY GSTQ SNPS LKS	4 8	RVIIS VDTS KNQF SLKLS SVTA ADTA VYYC AR	4 9	EVGRI AVAG WFFD L	5 0	WGRG TLVT VSS

Tabla 4. Secuencias del LCDR1-3 y LFWR1-4 de los anticuerpos (según el sistema combinado de Kabat y Chothia)

Ab	SEQ ID NO :	LFWR 1	SEQ ID NO :	LCDR 1	SEQ ID NO :	LFWR 2	SEQ ID NO :	LCDR 2	SEQ ID NO :	LFWR 3	SEQ ID NO :	LCDR 3	SEQ ID NO :	LFWR 4
PR3 001 59	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL QPDD FATFY C	1 3	QQYN SYSR T	1 4	FGQG TKVEI K
PR3 001 59-1	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL QPDD FATFY C	1 8	QQYS SYSR T	1 4	FGQG TKVEI K
PR3 001 59-3	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL	1 3	QQYN SYSR T	1 4	FGQG TKVEI K

										QPDD FATFY C				
PR3 001 59-4	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL QPDD FATFY C	1 9	QQYN AYSR T	1 4	FGQG TKVEI K
PR3 001 59-5	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL QPDD FATFY C	2 0	QQYQ SYSR T	1 4	FGQG TKVEI K
PR3 001 59-6	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL QPDD FATFY C	2 1	QQYN TYSR T	1 4	FGQG TKVEI K
PR3 001 59-7	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL QPDD FATFY C	2 2	QQYT SYSR T	1 4	FGQG TKVEI K
PR3 001 59-8	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL QPDD FATFY C	2 3	QQYA SYSR T	1 4	FGQG TKVEI K

PR3 001 59-9	8	DIQMT QSPS TLSAS VGDR VTITC	9	RASQ SISR WLA	1 0	WYQ QKPG KAPK LLIY	1 1	KASS LES	1 2	GVPS RFSG SGSG TEFTL TISNL QPDD FATFY C	1 9	QQYN AYSR T	1 4	FGQG TKVEI K
PR3 001 86	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	5 2	RASQ SVNS NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K
PR3 001 86-2	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	5 2	RASQ SVNS NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K
PR3 001 86-3	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	5 2	RASQ SVNS NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K
PR3 001 86-4	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	6 1	RASQ SVQS NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K
PR3 001 86-5	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	6 1	RASQ SVQS NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K

PR3 001 86-6	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	5 2	RASQ SVNS NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K
PR3 001 86-7	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	6 2	RASQ SVNA NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K
PR3 001 86-8	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	6 2	RASQ SVNA NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K
PR3 001 86-9	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	6 2	RASQ SVNA NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K
PR3 001 86-10	5 1	EIVMT QSPA TLSVS PGER ATLSC	6 2	RASQ SVNA NLA	5 3	WYQ QKPG QAPR LLIY	5 4	GAST RAT	5 5	GIPAR FSGS GSGT EFTLTI SSLQS EDFAV YYC	5 6	QQYN NWPL T	5 7	FGQG TRLEI K

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las antes mencionadas características y ventajas de la invención, así como características adicionales y ventajas del mismo serán más claramente entendidos de ahora en adelante como resultado de una descripción detallada de las siguientes modalidades cuándo se toma

5 conjuntamente con los dibujos.

Las modalidades descritas en el presente documento con referencia a los dibujos son explicativas, ilustrativas y se utilizan para comprender en general la presente invención. Las modalidades no deben interpretarse como limitativas del alcance de la presente invención. Los elementos iguales o similares y los elementos que tienen funciones iguales o similares se denotan por números de referencia similares a lo largo de las descripciones.

A menos que se indique o defina lo contrario, todos los términos utilizados tienen su significado habitual en la técnica, que resultará claro para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales habituales, como Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kibl, H. eds., "A multilingual glossary of biotechnological terms: (Recomendaciones de la IUPAC)", Helvetica Chimica Acta (1995), CH-4010 Basilea, Suiza; Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel y otros, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing y Wiley InterScience, Nueva York (1987); Roitt y otros, "Immunology (6.ª ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); y Janeway y otros, "Immunobiology" (6.ª ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como la bibliografía general citada anteriormente.

En el presente documento, las formas singulares "un", "una", "la" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de anticuerpos.

A menos que se indique o defina de otro modo, debe entenderse que el término "comprende", y sus variantes como "comprenden" y "que comprende", implican la inclusión de un elemento o etapa o un grupo de elementos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o etapa o grupo de elementos o etapas. El término "que comprende" engloba tanto "que incluye" como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$ o $x \pm 5\%$.

Tal y como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno específico. Un anticuerpo a menudo comprende una región variable y una región constante en cada una de las cadenas pesada y ligera. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones

constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento como Clq, el primer componente de la vía clásica de activación del complemento. La mayoría de los anticuerpos tienen una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) que juntas forman la porción del anticuerpo que se une al antígeno.

Una "región variable de cadena ligera" (VL) o una "región variable de cadena pesada" (VH) consta de cuatro regiones "marco" interrumpidas por tres "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR, por sus siglas en inglés". Las regiones marco sirven para alinear las CDR para la unión específica a un epítipo de un antígeno. Las CDR incluyen los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son los principales responsables de la unión al antígeno. Desde el amino-terminal hasta el carboxilo-terminal, los dominios VL y VH comprenden las siguientes regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) y CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VL también se denominan en el presente documento, respectivamente, LCDR1, LCDR2 y LCDR3; las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VH también se denominan en el presente documento, respectivamente, HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

La asignación de aminoácidos a cada dominio VL y VH se ajusta a cualquier definición convencional de CDR. Las definiciones convencionales incluyen la definición de Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), la definición de Chothia (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342:878-883, 1989); un compuesto de CDR de Chothia Kabat (también denominado CDR combinado de Chothia y Kabat), en donde cada CDR es un compuesto de CDR de Chothia y Kabat; la definición AbM utilizada por el software de modelado de anticuerpos de Oxford Molecular; y, la definición de contacto de Martin et al. (web mundial bioinfo.org.uk/abs). Kabat proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (sistema de numeración de Kabat) en donde a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número.

La presente divulgación incluye CDR definidos de acuerdo con cualquiera de estos sistemas de numeración, aunque las modalidades preferidas incluyen CDR definidos por Chothia y Kabat Combined.

Tabla 5. Los métodos de definición de las CDR de un anticuerpo (véase <http://bioinf.org.uk/abs/>)

	Kabat	Chothia	Combinado
LCDR1	L24--L34	L24--L34	L24-L34
LCDR2	L50--L56	L50--L56	L50-L56
LCDR3	L89--L97	L89--L97	L89-L97
HCDR1	H31--H35	H26--H32	H26-H35
HCDR2	H50--H65	H52--H56	H50-H65
HCDR3	H95--H102	H95--H102	H95-H102

En la Tabla 5, Laa-Lbb puede referirse a la secuencia de aminoácidos desde la posición aa (según el sistema de numeración de Chothia) hasta la posición bb (según el sistema de numeración de Chothia) a partir del extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo; y Haa-Hbb puede referirse a la secuencia de aminoácidos desde la posición aa (según el sistema de numeración de Chothia) hasta la posición bb (según el sistema de numeración de Chothia) a partir del extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo. Por ejemplo, L24-L34 puede referirse a la secuencia de aminoácidos de la posición 24 a la posición 34 (según el sistema de numeración de Chothia) empezando por el N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo; y H26-H32 puede referirse a la secuencia de aminoácidos de la posición 26 a la posición 32 (según el sistema de numeración de Chothia) empezando por el N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza aquí, debe entenderse en su sentido más amplio, e incluye anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos que contengan al menos dos regiones de unión a antígenos diferentes (por ejemplo,

anticuerpos biespecíficos). El anticuerpo puede contener modificaciones adicionales, como aminoácidos no naturales, mutaciones en las regiones Fc y mutaciones en los sitios de glicosilación. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos modificados postraducción, proteínas de fusión que contienen los determinantes antigénicos del anticuerpo y moléculas de inmunoglobulina que contienen cualquier otra modificación en los sitios de reconocimiento del antígeno, siempre que estos anticuerpos presenten la actividad biológica deseada.

Como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, MSLN). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser desempeñada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa.

Entre los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno englobados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente formado por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente formado por dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTALIMMUNOLOGY (Paul ed., 3^{sup}.rd ed. 1993)); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (v) un fragmento Fd' que tiene los dominios VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el C-terminal del dominio CH1; (vi) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (vii) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; (viii) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR); y (ix) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una única cadena proteica en donde las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (lo que se conoce como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también se incluyen en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Además, el término también incluye un "anticuerpo lineal" que comprende un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1), que forma una región de unión a antígeno junto con un polipéptido de cadena ligera complementario, y una versión modificada de cualquiera de los fragmentos anteriores, que conserva la actividad de unión a antígeno.

Estos fragmentos de unión a antígenos pueden obtenerse mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y la utilidad de los fragmentos se comprueba del mismo modo que la de los anticuerpos intactos.

5 Tal y como se utiliza aquí, el término "unión" o "unión específica" se refiere a una reacción de unión no aleatoria entre dos moléculas, como entre un anticuerpo y su antígeno diana. La especificidad de unión de un anticuerpo puede determinarse en función de la afinidad y/o la avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo (K_D), es una medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico (epítopo) y un sitio de unión al antígeno en el anticuerpo: cuanto
10 menor sea el valor de la K_D , mayor será la fuerza de unión entre un determinante antigénico (epítopo) y el anticuerpo. Alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (K_A), que es $1/K_D$.

La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo y el antígeno pertinente. La avidéz está relacionada tanto con la afinidad entre un determinante antigénico (epítopo) y su sitio de unión al antígeno en el anticuerpo como con el número de sitios de
15 unión pertinentes presentes en el anticuerpo. Típicamente, un anticuerpo se unirá con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} M o menos, y preferentemente de 10^{-7} a 10^{-12} M o menos y más preferentemente de 10^{-8} a 10^{-12} M, y/o con una afinidad de unión de al menos 10^7 M⁻¹, preferentemente de al menos 10^8 M⁻¹, más preferentemente al menos 10^9 M⁻¹, tal como al menos 10^{12} M⁻¹. Cualquier valor de K_D superior a 10^{-4} M se considera generalmente indicativo de unión inespecífica. Específicamente, la unión de un anticuerpo a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida per se, incluyendo, por ejemplo, el análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), enzimoimmunoensayos (EIA), ensayo de
20 interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés) y ensayos de competencia sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas per se en la técnica.

El término "epítopo" se refiere a un lugar de un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítopo puede estar formado por aminoácidos contiguos o no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítopos formados a partir de aminoácidos
30 contiguos (también conocidos como epítopos lineales) suelen conservarse al exponerlos a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario (también conocidos como epítopos conformacionales) suelen perderse al tratarlos con disolventes desnaturizantes. Un epítopo suele incluir al menos 3, y más habitualmente, al

menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. El epítipo define el sitio de unión más pequeño de un anticuerpo y, por tanto, es la diana específica del anticuerpo o de su fragmento de unión a antígeno.

Tal y como se utiliza aquí, el término "identidad de secuencia" se refiere al grado en que dos secuencias (aminoácido) tienen el mismo residuo en las mismas posiciones en un alineamiento. Por ejemplo, "una secuencia de aminoácidos es X% idéntica a SEQ ID NO: Y" se refiere al % de identidad de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: Y y se elabora como X% de los residuos de la secuencia de aminoácidos son idénticos a los residuos de la secuencia divulgada en SEQ ID NO: Y. Generalmente, se emplean programas informáticos para estos cálculos. Algunos programas ejemplares que comparan y alinean pares de secuencias son ALIGN (Myers y Miller, 1988), FASTA (Pearson y Lipman, 1988; Pearson, 1990) y gapped BLAST (Altschul et al., 1997), BLASTP, BLASTN o GCG (Devereux et al., 1984).

Asimismo, al determinar el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, el experto puede tener en cuenta las denominadas sustituciones "conservadoras" de aminoácidos, que en general pueden describirse como sustituciones de aminoácidos en donde un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido de estructura química similar y que influye poco o nada en la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Tales sustituciones conservadoras de aminoácidos son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, en WO 04/037999, GB-A-2 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y pueden seleccionarse tipos y/o combinaciones (preferidos) de tales sustituciones basándose en las enseñanzas pertinentes de WO 04/037999, así como de WO 98/49185 y de las referencias adicionales citadas en los mismos.

Tales sustituciones conservadoras son preferiblemente sustituciones en donde un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) - (e) es sustituido por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) pequeños residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares con carga negativa y sus amidas (sin carga): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) grandes residuos alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

Las sustituciones conservadoras especialmente preferidas son las siguientes: Ala en Gly o en Ser; Arg en Lys; Asn en Gln o en His; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; His en Asn o en Gln; Ile en Leu o en Val; Leu en Ile o en Val; Lys en Arg, en Gln o en Glu; Met en Leu, en Tyr o en Ile; Phe en Met, en Leu o en Tyr; Ser en Thr;

Thr en Ser; Trp en Tyr; Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en Ile o en Leu.

Cualquier sustitución de aminoácidos aplicada a los polipéptidos aquí descritos también puede basarse en el análisis de las frecuencias de las variaciones de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrollado por Schulz et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, en los análisis de los potenciales de formación de estructuras desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, y en el análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollado por Eisenberg et al., Proc. Nat. Acad Sci. USA 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle, J Mol. Biol. 157: 105-132, 1981, y Goldman et al., Ann. Rev. Biophys. Química. 15: 321-353, 1986, todos ellos incorporados aquí en su totalidad por referencia.

Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea. Es decir, cada uno de los anticuerpos que constituyen la población es el mismo, salvo posibles mutaciones naturales en pequeña cantidad. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único antígeno. El término "anticuerpo monoclonal" no se limita a los anticuerpos producidos por tecnología de hibridoma, y no debe interpretarse como un requisito para la producción de anticuerpos por un método específico.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo biespecífico" debe entenderse como un anticuerpo que tiene dos regiones de unión a antígeno diferentes definidas por secuencias de anticuerpo diferentes. Esto puede entenderse como la unión a diferentes dianas, pero también incluye la unión a diferentes epítomos en una diana.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno asociado a tumores" se refiere a un antígeno que se expresa de forma diferencial en las células cancerosas en comparación con las células normales y, por lo tanto, puede utilizarse para dirigirse a las células cancerosas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido.

Tal y como se utiliza aquí, el término "célula huésped" se refiere a una célula en donde se ha introducido un vector de expresión.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa que el portador o adyuvante es compatible con los demás ingredientes de la composición y no es sustancialmente nocivo para

el receptor de la misma y/o que dicho portador o adyuvante está aprobado o puede aprobarse para su inclusión en una composición farmacéutica para administración parenteral a seres humanos.

En el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares se refieren a la administración de un agente o a la modalidad de un procedimiento con el fin de obtener un efecto. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una enfermedad o de sus síntomas y/o puede ser terapéutico en términos de curación parcial o total de una enfermedad y/o de sus síntomas. "Tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, puede incluir el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o de un síntoma de la misma en un sujeto que puede estar predispuesto a padecerla pero al que aún no se le ha diagnosticado (por ejemplo, incluyendo enfermedades que pueden estar asociadas a una enfermedad primaria o causadas por ella); (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar su regresión. Tratar puede referirse a cualquier indicio de éxito en el tratamiento, la mejora o la prevención de un cáncer, incluido cualquier parámetro objetivo o subjetivo, como la reducción, la remisión, la disminución de los síntomas o hacer que la enfermedad sea más tolerable para el paciente, la ralentización del ritmo de degeneración o declive, o hacer que el punto final de la degeneración sea menos debilitante. El tratamiento o la mejora de los síntomas se basa en uno o varios parámetros objetivos o subjetivos, incluidos los resultados de un examen médico. En consecuencia, el término "tratar" incluye la administración de los anticuerpos o composiciones o conjugados aquí divulgados para prevenir o retrasar, aliviar o detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o afecciones asociados con enfermedades (por ejemplo, cánceres). El término "efecto terapéutico" se refiere a la reducción, eliminación o prevención de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o los efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto.

El término "cantidad eficaz", tal como se utiliza aquí, significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento de dicha enfermedad.

El término "sujeto", tal y como se utiliza aquí, se refiere a cualquier sujeto mamífero para el que se desea un diagnóstico, tratamiento o terapia. "Mamífero" a efectos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, los animales domésticos y de granja, y los animales de laboratorio, de zoológico,

deportivos o de compañía, como perros, caballos, gatos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, ratones, ratas, conejos, cobayas, monos, etc.

Los términos "cyno", "cynomolgus" y "macacos cynomolgus" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a la MSLN del mono cynomolgus. El término incluye cualquier variante de MSLN, isoformas y especies homólogas que se expresen de forma natural en células de mono cynomolgus, o que se expresen en células transfectadas con genes o ADNc que codifiquen el MSLN de mono cynomolgus que se expresen de forma natural en células de mono cynomolgus.

Anticuerpos anti-MSLN

La invención proporciona anticuerpos anti-mesotelina.

En un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la mesotelina, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), y en donde

(1) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27;

(2) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28;

(3) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27;

(4) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29;

(5) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30;

(6) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31;

5 (7) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32;

(8) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33;

10 (9) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29;

(10) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 63, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que
15 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67;

(11) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 64, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67;

(12) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que
20 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67;

(13) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 68;

25 (14) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 63, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 68;

(15) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 66, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que
30 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67;

(16) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 64, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 69;

5 (17) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 66, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 69;

(18) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 63, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 69; o

10 (19) la VH comprende los HCDRs 1-3 de una VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65, y la VL comprende los LCDRs 1-3 de una VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 69.

En algunas modalidades, los LCDR 1-3 y los HCDR 1-3 se definen mediante el sistema de definición/numeración EU Kabat. En algunas modalidades, los LCDR 1-3 y los HCDR 1-3 se definen mediante el sistema de definición/numeración de Chothia. En algunas modalidades, los LCDR 1-3 y los HCDR 1-3 se definen mediante el sistema de definición/numeración AbM. En algunas modalidades preferidas, los LCDR 1-3 y los HCDR 1-3 se definen mediante el sistema de numeración combinada de Kabat y Chothia.

20 En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), y en donde

(1) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 13 respectivamente;

(2) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 15, 16, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 18 respectivamente;

(3) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 15, 17, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 13 respectivamente;

5 (4) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 19 respectivamente;

10 (5) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 20 respectivamente;

15 (6) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 21 respectivamente;

20 (7) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 22 respectivamente;

(8) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 23 respectivamente;

25 (9) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 15, 16, 6 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 9, 11, 19 respectivamente;

30 (10) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 45, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 52, 54, 56

respectivamente;

5 (11) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 52, 54, 56 respectivamente;

(12) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 59, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 52, 54, 56 respectivamente;

10 (13) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 59, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 61, 54, 56 respectivamente;

15 (14) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 45, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 61, 54, 56 respectivamente;

20 (15) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 60, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 52, 54, 56 respectivamente;

25 (16) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 62, 54, 56 respectivamente;

(17) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 60, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 62, 54, 56 respectivamente;

30 (18) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos

establecidas en SEQ ID NOs: 45, 47, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 62, 54, 56 respectivamente; o

- 5 (19) el VH comprende HCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 58, 59, 49 respectivamente, y la VL comprende LCDRs 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 62, 54, 56 respectivamente.

En algunas modalidades, las CDR se determinan mediante el sistema combinado de Kabat Chothia.

- 10 En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), y en donde

- 15 (1) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27;

- 20 (2) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
25 SEQ ID NO: 28;

- (3) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 26, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
30 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27;

(4) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29;

(5) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 30;

(6) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 31;

(7) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 32;

(8) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 33;

(9) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %

o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29;

5 (10) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 63, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
10 SEQ ID NO: 67;

 (11) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 64, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
15 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 67;

 (12) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 65, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
20 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 67;

 (13) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 65, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
25 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 68;

 (14) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 63, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
30 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 63, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos

un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 68;

5 (15) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 66, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 67;

10 (16) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 64, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 69;

15 (17) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 66, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
20 SEQ ID NO: 69;

(18) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 63, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
25 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 69; o

(19) el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 65, y la VL comprende una secuencia
30 de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 69.

En algunas modalidades, el VL comprende una variante funcional de la secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de los SEQ ID NOs: 27-33, y 67-69 formadas por inserción, deleción y/o sustitución de uno o más aminoácido(s) en las mismas, siempre que el anticuerpo que comprende la VL que comprende la variante funcional conserve la capacidad de unirse a MSLN. En algunas modalidades, el VH comprende una variante funcional de la secuencia de aminoácidos tal como se establece en cualquiera de los SEQ ID NO: 24-26, y 63-66 formadas por inserción, deleción y/o sustitución de uno o más aminoácido(s) en las mismas, siempre que el anticuerpo que comprende la VH que comprende la variante funcional conserve la capacidad de unirse a MSLN.

La variante funcional comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido parental. Por ejemplo, la variante funcional de cualquiera de los SEQ ID NOs: 27-33, y 67-69 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NOs: 27-33, y 67-69, respectivamente. Por ejemplo, la variante funcional de cualquiera de los SEQ ID NO: 24-26 y 63-66 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NO: 24-26, y 63-66.

En algunas modalidades, la variante funcional de cualquiera de los SEQ ID NOs: 27-33, y 67-69 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con

cualquiera de los SEQ ID NOs: 27-33, y 67-69 y formados por inserción, delección y/o sustitución de uno o más aminoácido(s) en cualquiera de los SEQ ID NOs: 27-33, y 67-69. En algunas modalidades, la variante funcional de cualquiera de los SEQ ID NO: 24-26 y 63-66 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 % o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NO: 24-26, y 63-66 y formados por inserción, delección y/o sustitución de uno o más aminoácido(s) en cualquiera de los SEQ ID NO: 24-26, y 63-66.

En el contexto de la variante funcional, el número del aminoácido insertado, suprimido y/o sustituido es preferiblemente no superior al 40 % del número total de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos padre, más preferiblemente no superior al 35 %, más preferiblemente 1-33 %, y más preferiblemente 5-30 %, más preferiblemente 10-25 %, más preferiblemente 15-20 %. Por ejemplo, el número de aminoácidos insertados, eliminados y/o sustituidos puede ser de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 7, aún más preferiblemente de 1 a 5, y lo más preferiblemente de 1 a 2. En una modalidad preferida, el número del aminoácido insertado, suprimido y/o sustituido es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En algunas modalidades, la inserción, delección y/o sustitución puede llevarse a cabo en regiones marco (FR), por ejemplo, en FR1, FR2, FR3, y/o FR4.

En algunas modalidades, la sustitución de uno o más aminoácidos puede ser una sustitución conservadora de uno o más aminoácidos. Tales sustituciones conservadoras son preferiblemente sustituciones en donde un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a)-(e) es sustituido por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) pequeños residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares con carga negativa y sus amidas (sin carga): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) grandes residuos alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

Las sustituciones conservadoras especialmente preferidas son las siguientes: Ala en Gly o en Ser; Arg en Lys; Asn en Gln o en His; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; His en Asn o en Gln; Ile en Leu o en Val; Leu en Ile o en Val; Lys en Arg, en Gln o en Glu; Met en Leu, en Tyr o en Ile; Phe en Met, en Leu o en Tyr; Ser en Thr; Thr en Ser; Trp en Tyr; Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en Ile o en Leu.

[illegible]

establece en SEQ ID NO: 69 y la VH comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 63; o la VL comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 69 y la VH comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 65.

5 Basándose en la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada del anticuerpo, una molécula de inmunoglobulina puede dividirse en cinco clases (isotipos): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y pueden dividirse a su vez en diferentes subtipos, como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, etc. La cadena ligera del anticuerpo puede clasificarse como cadena lambda (λ) o cadena kappa (κ), basándose en la secuencia de aminoácidos de
10 la cadena ligera. Los anticuerpos aquí divulgados pueden ser de cualquiera de las clases o subtipos anteriores.

En algunas modalidades, el anticuerpo puede ser de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. En algunas modalidades, el anticuerpo puede ser de un subtipo seleccionado del grupo formado por IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una modalidad
15 preferida, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

El anticuerpo aquí descrito puede ser un anticuerpo intacto o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El fragmento de unión al antígeno puede ser cualquier fragmento del anticuerpo que conserve la capacidad de unirse específicamente a MSLN. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen, entre otros, un fragmento Fab; un fragmento F(ab')₂;
20 un fragmento Fab'; un fragmento Fd; un fragmento Fd'; un fragmento Fv; un fragmento scFv; un fragmento dAb; una región aislada determinante de la complementariedad (CDR); un nanoanticuerpo; un anticuerpo lineal que comprenda un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1), y una versión modificada de cualquiera de los fragmentos anteriores, que conserve la actividad de unión al antígeno.

25 En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, y ds-scFv. En una modalidad preferida, el fragmento de unión al antígeno es Fab o scFv.

En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, en donde el
30 anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) y una cadena ligera (LC), y en donde:

(1) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al

menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
5 SEQ ID NO: 37;

(2) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 35, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
10 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38;

(3) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 36, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
15 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 37;

(4) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
20 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 39;

(5) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
25 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 40;

(6) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia
30

de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41;

5 (7) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 42;

10 (8) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
15 SEQ ID NO: 43;

(9) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 35, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos
20 un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 39;

(10) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 70, y la LC comprende una secuencia
25 de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 74;

(11) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %
30 o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 71, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con

SEQ ID NO: 74;

5 (12) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 72, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 74;

10 (13) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 72, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 75;

15 (14) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 70, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 75;

20 (15) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 73, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
25 SEQ ID NO: 74;

(16) el HC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 71, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con
30 SEQ ID NO: 76;

al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NOs: 37-43, y 74-76, respectivamente. Por ejemplo, la variante funcional de cualquiera de los SEQ ID NOs: 34-36, y 70-73 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NOs: 34-36, y 70-73 respectivamente.

En algunas modalidades, el número del aminoácido insertado, suprimido y/o sustituido es preferiblemente no más del 40 % del número total de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos padre, más preferiblemente no más del 35 %, más preferiblemente 1-33 %, y más preferiblemente 5-30 %, más preferiblemente 10-25 %, más preferiblemente 15-20 %. Por ejemplo, el número de aminoácidos insertados, eliminados y/o sustituidos puede ser de 1-50, preferiblemente de 1-20, más preferiblemente de 1-10, aún más preferiblemente de 1-5. En una modalidad preferida, el número del aminoácido insertado, suprimido y/o sustituido es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En algunas modalidades, la inserción, delección y/o sustitución puede realizarse en regiones marco (FR), por ejemplo, en FR1, FR2, FR3 y/o FR4; y/o regiones constantes, por ejemplo, CL, CH1, CH2 y/o CH3.

En algunas modalidades, la sustitución de uno o más aminoácidos puede ser una sustitución conservadora de uno o más aminoácidos. Los ejemplos de sustituciones conservadoras son los descritos anteriormente.

En una modalidad preferida, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 37 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 34; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 38 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 35; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 37 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 36; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 39 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 34; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 40 y la cadena pesada

comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 34; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 41 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 34; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 42 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 34; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 43 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 34; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 39 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 35; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 74 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 70; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 74 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 71; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 74 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 72; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 75 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 72; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 75 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 70; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 74 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 73; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 76 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 71; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 76 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 73; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 76 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 70; o la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 76 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO: 72.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, la región Fc puede ser de cualquier isotipo, incluyendo, pero sin limitarse a,

IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y puede comprender una o más mutaciones o modificaciones. En una modalidad, la región Fc es de isotipo IgG1 o derivada del mismo, opcionalmente con una o más mutaciones o modificaciones. En una modalidad, la región Fc es IgG1 Fc humana.

5 En una modalidad, la región Fc es deficiente en la función efectora. Por ejemplo, la región Fc puede ser de un isotipo IgG1, o de un tipo no IgG1, por ejemplo, IgG2, IgG3 o IgG4, que se ha mutado de tal manera que la capacidad de mediar funciones efectoras, como la ADCC, se ha reducido o incluso eliminado. Tales mutaciones se han descrito, por ejemplo, en Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006) y Hezareh M, J Virol.; 75(24):12161-12168 (2001). En algunas modalidades, la región Fc del anticuerpo comprende una Fc IgG1
10 de tipo silvestre con mutaciones L234A, L235A y G237A.

En algunas modalidades, el anticuerpo está mutado en uno o más sitios de modificaciones postraduccionales. En una modalidad, la región Fc comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación ligada a Asn o se manipula para eliminar la función efectora del anticuerpo.

15 La modificación postraducciona (PTM, por sus siglas en inglés) se observa ampliamente en las proteínas expresadas en células de mamíferos. A excepción de los sitios PTM conservados en el anticuerpo, por ejemplo, el sitio de N-glicosilación conservado en el dominio CH2 del anticuerpo IgG1, otros sitios PTM ocurridos dentro de los sitios de unión al antígeno del anticuerpo (es decir, las regiones CDR) pueden reducir la actividad de unión al
20 antígeno o reducir la estabilidad química. Por ejemplo, la desamidación o la isomerización pueden hacer que las moléculas sean inestables y heterogéneas. Para reducir la responsabilidad de la secuencia, los motivos PTM podrían eliminarse mediante mutaciones. Las secuencias VH o VL se exploraron por la presencia de motivos PTM, por ejemplo, motivos de isomerización (por ejemplo, DG). A continuación, el residuo "hotspot" (por ejemplo, D o G
25 en el motivo DG) se mutó por el residuo homólogo en la secuencia de la línea germinal u otro residuo con propiedades biofísicas similares.

Anticuerpo biespecífico

En un segundo aspecto, la presente solicitud proporciona un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que
30 comprende además una segunda región de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno. En algunas modalidades, el segundo antígeno puede ser un antígeno asociado a un tumor, una molécula de punto de control inmunitario o un antígeno de células inmunitarias.

Se han identificado muchos antígenos tumorales asociados a cánceres específicos. En algunas modalidades, los antígenos asociados a tumores son antígenos que pueden estimular potencialmente una respuesta inmunitaria específica del tumor evidente. Algunos de estos antígenos son codificados por células normales, pero no necesariamente expresados por células normales. Estos antígenos pueden caracterizarse como los que suelen ser silenciosos (es decir, no se expresan) en las células normales, los que sólo se expresan durante determinadas fases de diferenciación y los que se expresan a lo largo del tiempo, como los antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos del cáncer están codificados por genes celulares mutantes, como oncogenes (por ejemplo, el oncogén ras activado), genes supresores (por ejemplo, el p53 mutante) y proteínas de fusión producidas por deleciones internas o translocaciones cromosómicas. Otros antígenos del cáncer pueden estar codificados por genes víricos, como los que portan los virus tumorales de ARN y ADN. Muchos otros antígenos asociados a tumores y anticuerpos contra ellos son conocidos y/o están disponibles comercialmente, y también pueden ser producidos por los expertos en la materia.

Algunos ejemplos de antígenos asociados a tumores son, entre otros, 5T4, alfafetoproteína, CA-125, antígeno carcinoembrionario, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD40, CD56, CD79, CD78, CD123, CD138, c-Met, CSPG4, IgM, molécula 1 similar a la lectina de tipo C (CLL-1), EGFR, EGFRvIII, antígeno de tumor epitelial, ERBB2, FLT3, proteína de unión a folato, GD2, GD3, glicoproteína de envoltura gp41 del VIH-1, glicoproteína de envoltura gp120 del VIH-1, antígeno asociado a melanoma, CD200R1, MUC-1, p53 mutado, ras mutado, ROR1, VEGFR2, y combinaciones de los mismos.

En algunas modalidades, el segundo antígeno es un antígeno de células T. En algunas modalidades, el antígeno de células T puede seleccionarse del grupo que consiste en el receptor de células T (TCR), CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD28, CD44, CD62L, CD69, ICOS, 41-BB (CD137) y NKG2D o cualquier combinación de los mismos. 8, CD44, CD62L, CD69, ICOS, 41-BB (CD137) y NKG2D o cualquier combinación de los mismos.

En algunas modalidades, el segundo antígeno es una molécula de punto de control inmunitario. En algunas modalidades, la molécula de punto de control inmunitario puede seleccionarse del grupo formado por PD-1, PD-L1, CTLA-4 y similares.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende una única cadena polipeptídica que comprende la primera región de unión a antígeno y la segunda región de unión a antígeno, y opcionalmente una región Fc.

La región Fc puede ser de cualquier isotipo, incluidos, entre otros, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y puede comprender una o más mutaciones o modificaciones. En una modalidad, la región Fc es de isotipo IgG1 o derivada del mismo, opcionalmente con una o más mutaciones o modificaciones. En una modalidad, la región Fc es IgG1 Fc humana.

5 En una modalidad, la región Fc es deficiente en la función efectora. Por ejemplo, la región Fc puede ser de un isotipo IgG1, o de un tipo no IgG1, por ejemplo, IgG2, IgG3 o IgG4, que se ha mutado de tal manera que la capacidad de mediar funciones efectoras, como la ADCC, se ha reducido o incluso eliminado. Tales mutaciones se han descrito, por ejemplo, en Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006) y Hezareh M, J Virol.; 75(24):12161-
10 12168 (2001).

 En una modalidad, la región Fc comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación ligada a Asn o se manipula de otro modo para cambiar las propiedades de glicosilación. Por ejemplo, en una región Fc de IgG1, se puede utilizar una mutación N297Q para eliminar un sitio de glicosilación ligado a Asn. Por consiguiente, en una modalidad
15 específica, la región Fc comprende una secuencia IgG1 de tipo silvestre con una mutación N297Q. Por ejemplo, en una región Fc de IgG1, se puede utilizar una mutación N297Q para eliminar un sitio de glicosilación ligado a Asn. Por consiguiente, en una modalidad específica, la región Fc comprende una secuencia IgG1 de tipo silvestre con una mutación N297Q.

 En otra modalidad, la región Fc se somete a un proceso de glicoingeniería para reducir
20 la fucosa y mejorar así la ADCC, por ejemplo, mediante la adición de compuestos a los medios de cultivo durante la producción del anticuerpo, como se describe en el documento US2009317869 o como se describe en van Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350 o utilizando células FUT8 knockout, por ejemplo, como se describe en Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614. La ADCC puede optimizarse alternativamente utilizando el
25 método descrito por Umaña et al. (1999) Nature Biotech 17:176. En otra modalidad, la región Fc ha sido modificada para mejorar la activación del complemento, por ejemplo, como se describe en Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100:2411.

Ácidos nucleicos

 En un tercer aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una
30 secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" incluye polímeros nucleotídicos tanto monocatenarios como bicatenarios. Los nucleótidos que componen el ácido nucleico pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los dos tipos de nucleótidos. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de las bases, como los derivados de la bromouridina y la inosina, modificaciones de la ribosa, como la 2',3'-dideoxiribosa, y modificaciones de los enlaces internucleotídicos, como el fosforotioato, el fosforoditioato, el fosforoselenoato, el fosforodiselenoato, el fosforoanilotioato, el fosforaniladato y el fosforoamidato.

Por ejemplo, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada aquí divulgadas. La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idénticas a los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada divulgadas en el presente documento.

Por ejemplo, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera aquí divulgadas. La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idénticas a los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera divulgadas en el presente documento.

Por ejemplo, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican: (i) cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada aquí descritas y (ii) cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera aquí descritas. La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idénticas a los ácidos nucleicos que codifican: (i) cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada aquí descritas y (ii) cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera aquí descritas.

Por ejemplo, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada divulgadas en el presente documento.

En algunas modalidades, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que

codifican una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de los grupos de tres secuencias CDR divulgadas en el presente documento.

La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR que son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idénticas a las secuencias CDR de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada divulgadas en el presente documento.

En algunas modalidades, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idénticas a las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de cualquiera de los grupos de tres secuencias CDR divulgadas en el presente documento.

Por ejemplo, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera divulgadas en el presente documento.

En algunas modalidades, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende cualquiera de los grupos de tres secuencias CDR divulgadas en el presente documento.

La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR que son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idénticas a las secuencias CDR de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera divulgadas en el presente documento.

En algunas modalidades, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idénticas a las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de cualquiera de los grupos de tres secuencias CDR divulgadas en el presente documento.

Por ejemplo, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican: (i) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR de

cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada divulgadas en el presente documento y (ii) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera divulgadas en el presente documento. En algunas modalidades, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican (i) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de los grupos de tres secuencias CDR divulgadas en el presente documento y (ii) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende cualquiera de los grupos de tres secuencias CDR divulgadas en el presente documento. La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican: (i) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR que son al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las secuencias CDR de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada divulgadas en el presente documento y (ii) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR que son al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las secuencias CDR de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera divulgadas en el presente documento. En algunas modalidades, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican (i) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que son al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de cualquiera de los grupos de tres secuencias CDR descritos en el presente documento (ii) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idénticas a las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de cualquiera de los grupos de tres secuencias CDR descritos en el presente documento.

En algunas modalidades, el ácido nucleico es ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN). En algunas modalidades, la invención proporciona un ácido ribonucleico (ARN) que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento. En algunas modalidades, la invención proporciona un ácido desoxirribonucleico (ADN) que comprende una secuencia desoxinucleotídica que codifica el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento.

Por consiguiente, el ácido desoxirribonucleico (ADN) que comprende una secuencia desoxinucleotídica que codifica el anticuerpo anti MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento se utiliza para tratar una enfermedad. En algunas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) y cáncer de ovario.

En algunas modalidades, el ácido desoxirribonucleico (ADN) puede introducirse en las células de un cuerpo humano *in vivo*. En algunas modalidades, el ácido desoxirribonucleico (ADN) de la invención está comprendido en un vector o un agente de liberación. En algunas modalidades, el ácido desoxirribonucleico (ADN) de la invención se integra en el genoma de una célula.

En consecuencia, el ácido ribonucleico (ARN) que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento puede utilizarse para tratar una enfermedad. En algunas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) y cáncer de ovario.

En algunas modalidades, el ácido ribonucleico (ARN) puede introducirse en las células de un cuerpo humano *in vivo*. En algunas modalidades, el ácido ribonucleico (ARN) de la invención está comprendido en un vector o un agente de liberación.

En algunas modalidades específicas, el ácido ribonucleico (ARN) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento es un ARNm. En algunas modalidades, el ARNm de la invención está comprendido en un vector o un sistema de administración (como un lipidosoma). En algunas modalidades, el ARNm puede introducirse en las células de un cuerpo humano *in vivo* mediante un vector o un sistema de

entrega (tal como lipidosoma) y expresa un anticuerpo MSLN de la invención *in vivo*.

El ARNm de la invención puede utilizarse para tratar una enfermedad. En algunas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de
5 estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) y cáncer de ovario.

Vectores

En el cuarto aspecto, la invención proporciona además un vector, que comprende el ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo anti-
10 MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento.

En algunas modalidades, el vector es un vector de expresión recombinante capaz de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un
15 anticuerpo anti-MSLN. Por ejemplo, la invención proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente.

Cualquier vector puede ser adecuado para la presente divulgación. En algunas modalidades, el vector es un vector viral. En algunas modalidades, el vector es un vector
20 retroviral, un vector de ADN, un vector del virus de la leucemia murina, un vector SFG, un plásmido, un vector de ARN, un vector adenoviral, un vector baculoviral, un vector viral de Epstein Barr, un vector papoviral, un vector viral de vaccinia, un vector viral de herpes simple, un vector asociado a adenovirus (AAV), un vector lentiviral, o cualquier combinación de los mismos. Algunos ejemplos de vectores adecuados son, por ejemplo, pGAR, pBABE-puro,
25 pBABE-neo largeTcDNA, pBABE-hygro-hTERT, pMKO.1 GFP, MSCV-IRES-GFP, pMSCV PIG (plásmido vacío Puro IRES GFP), pMSCV-loxp-dsRed-loxp-eGFP-Puro-WPRE, MSCV IRES Luciferase, pMIG, MDH1-PGK-GFP_2.0, TtRMPVIR, pMSCV-IRES-mCherry FP, pRetroX GFP T2A Cre, pRXTN, pLncEXP y pLXIN-Luc.

Un vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector de expresión
30 recombinante adecuado. Entre los vectores adecuados se encuentran los diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambas, como los plásmidos y los virus. Por

ejemplo, puede seleccionarse un vector de la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Md.), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). También pueden utilizarse vectores bacteriófagos, como λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. Algunos ejemplos de vectores de expresión vegetal útiles en el contexto de la divulgación son pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Ejemplos de vectores de expresión animal útiles en el contexto de la divulgación comprenden pcDNA, pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech).

Los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante descritas, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. Pueden prepararse construcciones de vectores de expresión, circulares o lineales, que contengan un sistema de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, de ColEI, plásmido 2 μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino y similares.

Por consiguiente, el vector puede utilizarse para tratar una enfermedad. En algunas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) y cáncer de ovario. El vector de la invención puede introducirse en una célula. En algunas modalidades, el vector de la invención puede introducirse en una célula *in vitro* o *ex vivo*. Opcionalmente, la célula introducida con el vector puede administrarse posteriormente en el cuerpo de un sujeto. En algunas modalidades, el vector de la invención puede introducirse en una célula *in vivo*.

Por ejemplo, el vector puede ser un vector adenoviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento. El vector puede administrarse en el cuerpo de un sujeto, y luego entrar en una célula del sujeto *in vivo*, con lo que la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento o el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento se integra en

el genoma de la célula, y posteriormente la célula expresa el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento para tratar las enfermedades divulgadas en el presente documento.

Células huésped

5 En el quinto aspecto, la invención proporciona además una célula huésped que comprende el ácido nucleico divulgado en el presente documento o el vector divulgado en el presente documento.

10 Cualquier célula puede utilizarse como célula huésped para los ácidos nucleicos o los vectores de la presente divulgación. En algunas modalidades, la célula puede ser una célula procariota, una célula fúngica, una célula de levadura, o células eucariotas superiores tales como una célula de mamífero. Las células procariotas adecuadas incluyen, sin limitación, eubacterias, como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobactehaceae* como *Escherichia*, e.g., *E. coli*; *Enterobacter*, *Erwinia*; *Klebsiella*; *Proteus*; *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*,
15 y *Shigella*; *Bacilli* como *B. subtilis* y *B. licheniformis*; *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*; y *Streptomyces*. En algunas modalidades, la célula es una célula humana. En algunas modalidades, la célula es una célula inmunitaria. En algunas modalidades, las células huésped incluyen, por ejemplo, células CHO, como células CHOS y células CHOK1, o células HEK293, como HEK293A, HEK293T y HEK293FS.

20 La célula huésped de la invención se prepara introduciendo el vector divulgado en el presente documento o el ácido nucleico divulgado en el presente documento *in vitro* o *ex vivo*. La célula huésped de la invención puede administrarse en el cuerpo de un sujeto, y la célula huésped expresa el anticuerpo anti-MSLN o el fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento *in vivo* para tratar las enfermedades divulgadas en el
25 presente documento.

 La invención proporciona además células huésped en donde se ha introducido cualquiera de los vectores mencionados anteriormente. La invención proporciona además métodos para producir los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención cultivando las células huésped en condiciones que permitan la producción de los anticuerpos o
30 fragmentos de anticuerpos, y recuperando los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos así producidos.

Conjugado anticuerpo-fármaco

En el sexto aspecto, la invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto de la invención o el anticuerpo biespecífico del segundo aspecto de la invención.

5 En el contexto de la presente divulgación, un "conjugado" es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (como un fragmento de unión a antígeno) unido covalentemente a una molécula efectora o a una segunda proteína (como un segundo anticuerpo). La molécula efectora puede ser, por ejemplo, un fármaco, una toxina, un agente terapéutico, una etiqueta detectable, una proteína, un ácido nucleico, un lípido, una nanopartícula, un carbohidrato o un virus
10 recombinante. Un conjugado de anticuerpos suele denominarse "inmunoconjugado". Cuando el conjugado comprende un anticuerpo unido a un fármaco (*por ejemplo*, un agente citotóxico), el conjugado suele denominarse "conjugado anticuerpo-fármaco" o "ADC". Otros conjugados de anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos (como biespecíficos o triespecíficos).

15 En algunas modalidades, la molécula efectora puede ser una etiqueta detectable o una inmunotoxina. Ejemplos específicos y no limitantes de toxinas incluyen, pero no se limitan a, abrina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE, como PE35, PE37, PE38 y PE40), toxina diftérica (DT), toxina botulínica o toxinas modificadas de las mismas, u otros agentes tóxicos que directa o indirectamente inhiben el crecimiento celular o matan células. Por ejemplo, el
20 PE y el DT son compuestos muy tóxicos que suelen provocar la muerte por toxicidad hepática. Sin embargo, la PE y la DT pueden modificarse para su uso como inmunotoxinas eliminando el componente nativo de la toxina (como el dominio la de la PE y la cadena B de la DT) y sustituyéndolo por una molécula diana diferente, como un anticuerpo. El término "conjugado" o "enlazado" puede referirse a la formación de dos polipéptidos en una molécula polipeptídica
25 contigua. En una modalidad, un anticuerpo se une a una molécula efectora. En otra modalidad, un anticuerpo unido a una molécula efectora se une además a un lípido u otra molécula a una proteína o péptido para aumentar su vida media en el organismo. La unión puede realizarse por medios químicos o recombinantes. En una modalidad, el enlace es químico, en donde una reacción entre la fracción de anticuerpo y la molécula efectora ha producido un enlace
30 covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula. Opcionalmente, puede incluirse un enlazador peptídico (secuencia peptídica corta) entre el anticuerpo y la molécula efectora.

La invención proporciona inmunoconjugados que incluyen un anticuerpo monoclonal o

fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento y una molécula efectora. En algunas modalidades, la molécula efectora es una toxina, como, por ejemplo, la exotoxina de *Pseudomonas* o una variante de la misma. En otras modalidades, la molécula efectora es una etiqueta detectable, como, por ejemplo, un fluoróforo, una enzima o un radioisótopo.

5 Los anticuerpos monoclonales divulgados pueden conjugarse con un agente terapéutico o molécula efectora. Los inmunoconjugados incluyen, entre otros, moléculas en donde existe una unión covalente de un agente terapéutico a un anticuerpo. Un agente terapéutico es un agente con una actividad biológica particular dirigida contra una molécula diana particular o una célula portadora de una molécula diana. Un experto en la materia
10 apreciará que los agentes terapéuticos pueden incluir diversos fármacos como vinblastina, daunomicina y similares, citotoxinas como exotoxina de *Pseudomonas* nativa o modificada o toxina diftérica, agentes encapsulantes (como liposomas) que contienen composiciones farmacológicas, agentes radiactivos como ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C , ^3H y ^{35}S y otras etiquetas, moléculas diana y ligandos.

15 La elección de un agente terapéutico concreto depende de la molécula o célula diana y del efecto biológico deseado. Así, por ejemplo, el agente terapéutico puede ser una citotoxina que se utiliza para provocar la muerte de una célula diana concreta (como una célula tumoral). Por el contrario, cuando se desea invocar una respuesta biológica no letal, el agente terapéutico puede conjugarse con un agente farmacológico no letal o con un liposoma que
20 contenga un agente farmacológico no letal.

 Con los agentes terapéuticos y anticuerpos aquí descritos, un experto puede construir fácilmente una variedad de clones que contengan ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, como ácidos nucleicos que difieren en secuencia pero que codifican la misma fracción efectora o secuencia de anticuerpo. Así, la presente divulgación proporciona ácidos
25 nucleicos que codifican anticuerpos y conjugados y proteínas de fusión de los mismos.

 Las moléculas efectoras pueden unirse a un anticuerpo de interés utilizando cualquier medio conocido por los expertos en la materia. Pueden utilizarse medios de fijación tanto covalentes como no covalentes. El procedimiento para unir una molécula efectora a un anticuerpo varía en función de la estructura química del efector. Los polipéptidos suelen
30 contener diversos grupos funcionales, como ácido carboxílico (COOH), amina libre ($-\text{NH}_2$) o grupos sulfhidrilo ($-\text{SH}$), que pueden reaccionar con un grupo funcional adecuado de un anticuerpo para dar lugar a la unión de la molécula efectora. Alternativamente, el anticuerpo se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización

puede implicar la unión de cualquiera de las moléculas enlazadoras conocidas. El enlazador puede ser cualquier molécula utilizada para unir el anticuerpo a la molécula efectora. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con la molécula efectora. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, entre otros, enlazadores de carbono de cadena recta o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (como mediante un enlace disulfuro a la cisteína) o a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

10 En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula efectora del anticuerpo cuando el inmunoconjugado ha alcanzado su sitio diana. Por lo tanto, en estas circunstancias, los inmunoconjugados comprenderán enlaces que son escindibles en las proximidades del sitio diana.

15 La ruptura del enlazador para liberar la molécula efectora del anticuerpo puede ser provocada por la actividad enzimática o las condiciones a las que se somete el inmunoconjugado, ya sea dentro de la célula diana o en las proximidades del lugar diana.

En vista del gran número de métodos que se han descrito para unir una variedad de compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, etiquetas (como enzimas o moléculas fluorescentes), fármacos, toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la materia podrá determinar un método adecuado para unir un agente dado a un anticuerpo u otro polipéptido.

25 Los anticuerpos aquí descritos pueden derivatizarse o unirse a otra molécula (como otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o una porción de los mismos se derivatiza de forma que la unión al antígeno diana no se vea afectada negativamente por la derivatización o el etiquetado. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar funcionalmente ligado (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares, como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que pueda mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (como una región del núcleo de la tavidina estreptocócica o una etiqueta de polihistidina).

30 Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce mediante la reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, como para crear anticuerpos biespecíficos).

Entre los reticulantes adecuados se incluyen los heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador adecuado (como el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) o los homobifuncionales (como el suberato de disuccinimidilo). Estos enlazadores están disponibles en el mercado.

5 El anticuerpo puede conjugarse con un marcador detectable; por ejemplo, un marcador detectable capaz de ser detectado por ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imagen (como la tomografía computarizada (CT, por sus siglas en inglés), la tomografía axial computarizada (CAT, por sus siglas en inglés), las imágenes por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), las imágenes por
10 resonancia magnética nuclear (NMRI, por sus siglas en inglés), la tomografía por resonancia magnética (MTR, por sus siglas en inglés), la ecografía, el examen con fibra óptica y el examen laparoscópico). Ejemplos específicos y no limitativos de marcadores detectables incluyen fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radiactivos y metales pesados o compuestos (por ejemplo, nanocristales de óxido de hierro
15 superparamagnético para la detección por resonancia magnética). Por ejemplo, los marcadores detectables útiles incluyen compuestos fluorescentes, entre ellos fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. También se utilizan marcadores bioluminiscentes, como la luciferasa, la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en
20 inglés) y la proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés). Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede conjugarse con enzimas útiles para la detección, como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con una enzima detectable, puede detectarse añadiendo reactivos adicionales que la enzima
25 utiliza para producir un producto de reacción que puede discernirse. Por ejemplo, cuando el agente peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina da lugar a un producto de reacción coloreado, que es detectable visualmente. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede conjugarse con biotina, y detectarse mediante medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina. Cabe
30 señalar que la propia avidina puede conjugarse con una enzima o una etiqueta fluorescente.

Un anticuerpo puede fusionarse a una etiqueta proteica de autoetiquetado (*por ejemplo*, HaloTag). Por ejemplo, la etiqueta proteínica podría clonarse al final de una región constante. HaloTag es una etiqueta proteínica autoetiquetada derivada de una enzima bacteriana (una haloalcano deshalogenasa), diseñada para unirse covalentemente a un ligando sintético. En

algunos casos, el ligando sintético comprende un enlazador cloroalcano unido a un fluoróforo, tal como un fluoróforo de infrarrojo cercano (Los *et al.* (2008) ACS Chem Biol. 3(6):373-82).

Un anticuerpo puede marcarse con un agente magnético, como el gadolinio. Los anticuerpos también pueden marcarse con lantánidos (como el europio y el disprosio) y manganeso.

Las partículas paramagnéticas, como el óxido de hierro superparamagnético, también se utilizan como etiquetas. Un anticuerpo también puede estar marcado con un epítipo polipeptídico predeterminado reconocido por un informador secundario (como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas). En algunas modalidades, las etiquetas están unidas por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir posibles obstáculos estéricos.

Un anticuerpo también puede marcarse con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede utilizarse tanto con fines diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede utilizarse para detectar la expresión de un antígeno diana mediante rayos X, espectros de emisión u otras técnicas de diagnóstico. Ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

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

Las toxinas pueden emplearse con los anticuerpos monoclonales aquí descritos para producir inmunotoxinas. Entre las toxinas ejemplares se incluyen la ricina, la abrina, la toxina diftérica y sus subunidades, así como las toxinas botulínicas A a F. Estas toxinas pueden obtenerse fácilmente de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Las toxinas contempladas también incluyen variantes de las toxinas descritas en el presente documento (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses No. 5.079.163 y No. 4.689.401). En una modalidad, la toxina es la exotoxina de *Pseudomonas* (PE, por sus siglas en inglés) (Patente estadounidense No. 5.602.095). En el presente documento, "exotoxina de *Pseudomonas*" se refiere a una PE nativa (natural) de longitud completa o a una PE modificada. Dichas modificaciones pueden incluir, entre otras, la eliminación del dominio Ia, diversas delecciones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de un

solo aminoácido y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo (por ejemplo, véase Siegall et al. Biol. Química. 264:14256-14261, 1989).

La PE empleada con los anticuerpos monoclonales aquí descritos puede incluir la secuencia nativa, fragmentos citotóxicos de la secuencia nativa y variantes conservadoramente modificadas de la PE nativa y sus fragmentos citotóxicos. Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen aquellos que son citotóxicos con o sin procesamiento proteolítico posterior o de otro tipo en la célula diana. Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen PE40, PE38 y PE35. Para una descripción adicional de PE y sus variantes, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses No. 4.892.827; 5.512.658; 5.602.095; 5.608.039; 5.821.238; y 5.854.044; la publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2015/0099707; las publicaciones PCT No. WO 99/51643 y WO 2014/052064; Pai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3358-3362, 1991; Kondo et al. J. Biol. Química. 263:9470-9475, 1988; Pastan et al, Biochim. Biophys. Acta 1333:C1-C6, 1997.

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

En algunos ejemplos, el PE es una variante resistente a la degradación lisosomal, como el PE-LR (Weldon et al., Blood 113(16):3792-3800, 2009; Publicación PCT No. WO 2009/032954). En otros ejemplos, el PE es una variante designada PE-LR/6X (Publicación PCT No. WO 2011/032022). En otros ejemplos, la variante PE es PE con inmunogenicidad reducida. En otros ejemplos, el PE es una variante designada PE-LR/8M (Publicación PCT No. WO 2011/032022).

La modificación del PE puede producirse en cualquier variante descrita anteriormente, incluidos los fragmentos citotóxicos del PE (por ejemplo, PE38, PE-LR y PE-LR/8M). Los PE modificados pueden incluir cualquier sustitución(es), como por ejemplo, para uno o más residuos de aminoácidos dentro de uno o más epítopos de células T y/o epítopos de células B del PE, o la supresión de uno o más epítopos de células T y/o células B (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2015/0099707). Las formas contempladas de PE también incluyen formas desinmunizadas de PE, por ejemplo, versiones con el dominio II eliminado (por ejemplo, PE24). Las formas desinmunizadas de PE se

describen, por ejemplo, en las publicaciones PCT No. WO 2005/052006, WO 2007/016150, WO 2007/014743, WO 2007/031741, WO 2009/32954, WO 2011/32022, WO 2012/154530 y WO 2012/170617.

Los anticuerpos aquí descritos también pueden utilizarse para dirigir cualquier número de compuestos diagnósticos o terapéuticos diferentes a las células que expresan el antígeno tumoral o vírico en su superficie. Así, un anticuerpo de la presente divulgación puede unirse directamente o mediante un enlazador a un fármaco que se va a administrar directamente a las células que expresan el antígeno de la superficie celular. Esto puede hacerse con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación. Los agentes terapéuticos incluyen compuestos como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glicoproteínas, radioisótopos, lípidos, carbohidratos o virus recombinantes. Las moléculas terapéuticas y de diagnóstico de ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivatizados para la reticulación covalente con ADN simple o dúplex, y oligonucleótidos formadores de tríplex.

Alternativamente, la molécula unida a un anticuerpo puede ser un sistema de encapsulación, como una nanopartícula, liposoma o micela que contenga una composición terapéutica como un fármaco, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido), u otra fracción terapéutica que preferiblemente esté protegida de la exposición directa al sistema circulatorio. Los medios para preparar liposomas unidos a anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, U.S. Patent No. 4.957.735; Connor et al., Pharm. Ther. 28:341-365, 1985).

Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden unirse de forma covalente o no covalente a una etiqueta detectable. Las etiquetas detectables adecuadas para tal uso incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las etiquetas útiles incluyen perlas magnéticas, colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^{32}P), enzimas (como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y otras utilizadas habitualmente en ELISA) y etiquetas colorimétricas como el oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (como poliestireno, polipropileno, látex y similares).

Los medios para detectar tales etiquetas son bien conocidos por los expertos en la materia. Así, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse utilizando películas fotográficas o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse

utilizando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan normalmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

5 **Composiciones farmacéuticas**

En el séptimo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto de la invención, o el anticuerpo biespecífico del segundo aspecto de la invención, o el ácido nucleico del tercer aspecto de la invención, o el vector del cuarto aspecto de la invención, o la célula huésped del quinto aspecto de la invención, o el ADC del sexto aspecto de la invención; y opcionalmente (ii) un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Por ejemplo, en algunas modalidades, una composición para administración intravenosa suele ser una solución en tampón acuoso isotónico estéril.

Los anticuerpos o agentes de la invención (también denominados en el presente documento "compuestos activos"), y sus derivados, fragmentos, análogos y homólogos, pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Tales composiciones comprenden típicamente el anticuerpo o agente y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, el término "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los soportes adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en este campo, que se incorpora aquí como referencia. Ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero

humano al 5 %. También pueden utilizarse liposomas y vehículos no acuosos, como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones.

5 También pueden incorporarse a las composiciones compuestos activos suplementarios.

Una composición farmacéutica de la invención está formulada para ser compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen la parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones
10 utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones
15 como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. El preparado parenteral puede presentarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones
20 acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). En todos los casos, la composición debe ser estéril
25 y fluida hasta el punto de que se pueda jeringar fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez
30 adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos

casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes
10 necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estérilmente del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden presentarse en cápsulas de gelatina o comprimidos. Para fines de
15 administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trozos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un portador fluido para su uso como enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se enjuaga y expectorado o tragado.
20 Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, troques y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente como almidón o lactosa, un agente desintegrador como ácido algínico, Primogel
25 o almidón de maíz; un lubricante como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de aerosol a partir de un recipiente a presión o dispensador que contiene un propulsor adecuado,
30 por ejemplo, un gas como el dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes adecuados a la barrera que se desea permeabilizar. Tales penetrantes son generalmente

conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales para supositorios, como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una modalidad, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, como el etilvinilacetato, los polianhídridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoésteres y el ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) también pueden utilizarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, los descritos en la Pat. No. 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformizar la dosificación. La forma unitaria de dosificación, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención es dictada por y directamente dependiente en las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular para ser logrado, y las limitaciones inherentes en el arte de compounding tal un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con las instrucciones de administración.

La invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-MSLN o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención se administrarán con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, administración, tolerancia y similares. En el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos se pueden encontrar multitud de formulaciones apropiadas: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (catiónicos o aniónicos) que contienen vesículas (como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también Powell et al. "Compendio de excipientes para formulaciones parenterales" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Métodos de producción

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado se inmuniza normalmente con un agente inmunizante para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro.

El agente inmunizante incluirá típicamente el antígeno proteico, un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano, o células de bazo o de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103) Las líneas celulares inmortalizadas suelen ser células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Por lo general, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células

parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

5 Las líneas celulares immortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan una expresión estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio como el medio HAT. Otras líneas celulares immortalizadas preferidas son las líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego,
10 California, y de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pp. 51-63)).

15 El medio de cultivo en donde se cultivan las células de hibridoma puede entonces analizarse para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a
20 enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Tales técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem, 107:220 (1980). Además, en las aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales, es importante identificar anticuerpos que tengan un alto grado de especificidad y una elevada afinidad de
25 unión por el antígeno diana.

Una vez identificadas las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos estándar. (Véase Goding, Anticuerpos monoclonales: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, el medio
30 Eagle modificado de Dulbecco y el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del líquido de ascitis mediante procedimientos

convencionales de purificación de inmunoglobulinas como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar mediante métodos de ADN recombinante, como los descritos en la patente U.S. Pat. No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped, como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) o células de mieloma que, por lo demás, no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación de los dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase la patente de EE.UU. U.S. Pat. No. 4.816.567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. Dicho polipéptido no inmunoglobulínico puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígenos de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos totalmente humanos son moléculas de anticuerpos en donde toda la secuencia de la cadena ligera y la cadena pesada, incluidas las CDR, proceden de genes humanos. Tales anticuerpos se denominan aquí "anticuerpos humanizados", "anticuerpos humanos" o "anticuerpos totalmente humanos". Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse mediante la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72); y la técnica del hibridoma VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos y pueden producirse utilizando hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con el virus de Epstein Barr in vitro (véase Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Además, los anticuerpos humanizados pueden producirse en plantas transgénicas, como alternativa de producción barata a los sistemas de mamíferos existentes. Por ejemplo, la planta transgénica puede ser una planta de tabaco, es decir, *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabaccum*. Los anticuerpos se purifican a partir de las hojas de la planta. La transformación estable de las plantas puede lograrse mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* o el bombardeo de partículas. Por ejemplo, los vectores de expresión de ácidos nucleicos que contienen al menos las secuencias de las cadenas pesada y ligera se expresan en cultivos bacterianos, es decir, en la cepa BLA4404 de *A. tumefaciens*, mediante transformación. La infiltración de las plantas puede realizarse mediante inyección. Los extractos solubles de hojas pueden prepararse triturando el tejido foliar en un mortero y centrifugándolo. El aislamiento y la purificación de los anticuerpos pueden realizarse fácilmente por muchos de los métodos conocidos por el experto en la materia. Otros métodos para la producción de anticuerpos en plantas se describen, por ejemplo, en Fischer et al, Vaccine, 2003, 21:820-5; y Ko et al, Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 332, 2009, pp. 55-78. Como tal, la presente invención proporciona además cualquier célula o planta que comprenda un vector que codifique el anticuerpo de la presente invención, o produzca el anticuerpo de la presente invención.

Además, un anticuerpo (humano) de interés puede producirse en hongos. Por ejemplo, el hongo puede ser *Myceliophthora thermophila* (e.g. *Myceliophthora thermophila* cepa C1; Visser et al. (2011) Industrial Biotechnology 7(3):214-223). Otros ejemplos incluyen especies de *Aspergillus* (e.g. *A. oryzae* (Huynh et al. (2020) Fungal Biology and Biotechnology 7:7), *A. niger* (Ward et al. (2004) Environ. Microbiol. 70:2567-76), o *A. awamori* (Joosten et al. (2003) Microb. Cell Fact 2:1)) y especies de *Trichoderma* (e.g. *T. reesei* (Nyyssönen et al. (1993) Biotechnology 11:591-595)). En otros casos, el hongo puede ser una levadura, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* o *Ogataea minuta* (Joosten et al. (2003); Suzuki et al. (2017) J Biosci Bioeng. 124:156-63).

Además, los anticuerpos humanos también pueden producirse mediante técnicas adicionales, como las bibliotecas de visualización de fagos. (Véase Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Del mismo modo, se pueden fabricar anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en donde los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o totalmente. Tras la provocación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en humanos en

todos los aspectos, incluida la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en los documentos WO 2006/008548, WO 2007/096779, WO 2010/109165, WO 2010/070263, WO 2014/141189 y WO 2014/141192.

5 Un método para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, se divulga en U.S. Pat. No. 5.916.771. Este método incluye la introducción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada en una célula huésped de mamífero en cultivo, la introducción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera en otra célula huésped de mamífero, y la fusión de las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida
10 expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena ligera.

En una mejora adicional de este procedimiento, en la publicación PCT WO 99/53049 se divulga un método para identificar un epítipo clínicamente relevante en un inmunógeno y un método correlativo para seleccionar un anticuerpo que se une inmuno-específicamente al epítipo relevante con alta afinidad.

15 El anticuerpo puede expresarse mediante un vector que contenga un segmento de ADN que codifique el anticuerpo de cadena simple descrito anteriormente.

Pueden incluir vectores, liposomas, ADN desnudo, ADN asistido por adyuvante, pistola de genes, catéteres, etc. Los vectores incluyen conjugados químicos como el descrito en el documento WO 93/64701, que tiene una fracción dirigida (por ejemplo, un ligando a un
20 receptor de superficie celular), y una fracción de unión a ácido nucleico (por ejemplo, polilisina), vector viral (por ejemplo, un vector viral de ADN o ARN), proteínas de fusión como la descrita en PCT/US 95/02140 (WO 95/22618), que es una proteína de fusión que contiene una fracción diana (por ejemplo, un anticuerpo específico para una célula diana) y una fracción de unión a un ácido nucleico (por ejemplo, una protamina), plásmidos, fagos, etc. Los vectores pueden
25 ser cromosómicos, no cromosómicos o sintéticos.

Los vectores preferidos incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen los virus de la leucemia murina de Moloney. Se prefieren los vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores pox como los vectores orthopox o avipox, vectores herpesvirus como el vector del virus del herpes simple I (VHS)
30 (véase Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci

USA 87:1149 (1990), Adenovirus Vectors (véase LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995) y Adeno-associated Virus Vectors (véase Kaplitt, M. G. et al., Nat. Genet. 8:148 (1994).

Los vectores virales de la viruela introducen el gen en el citoplasma celular. Los
5 vectores del virus avipox sólo dan lugar a una expresión a corto plazo del ácido nucleico. Se
prefieren los vectores adenovirus, los vectores de virus adenoasociados y los vectores de
virus del herpes simple (HSV, por sus siglas en inglés) para introducir el ácido nucleico en las
células neurales. El vector adenovirus da lugar a una expresión a más corto plazo
(aproximadamente 2 meses) que el virus adenoasociado (aproximadamente 4 meses), que a
10 su vez es más corto que los vectores HSV. El vector elegido dependerá de la célula diana y
de la enfermedad tratada. La introducción puede realizarse mediante técnicas estándar, por
ejemplo, infección, transfección, transducción o transformación. Algunos ejemplos de modos
de transferencia de genes son, por ejemplo, el ADN desnudo, la precipitación con CaPO_4 , el
dextrano DEAE, la electroporación, la fusión de protoplastos, la lipofección, la microinyección
15 celular y los vectores virales.

El vector puede emplearse para dirigirse esencialmente a cualquier célula diana
deseada. Por ejemplo, se puede utilizar la inyección estereotáctica para dirigir los vectores
(por ejemplo, adenovirus, HSV) a un lugar deseado. Además, las partículas pueden
administrarse mediante infusión intracerebroventricular (icv) utilizando un sistema de infusión
20 de minibomba, como un sistema de infusión SynchroMed. Un método basado en el flujo a
granel, denominado convección, también ha demostrado su eficacia para transportar
moléculas de gran tamaño a zonas extensas del cerebro y puede ser útil para transportar el
vector a la célula diana. (Véase Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994);
Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)). Otros métodos que pueden utilizarse
25 incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y vía oral
u otras vías de administración conocidas.

Estos vectores pueden utilizarse para expresar grandes cantidades de anticuerpos que
pueden utilizarse de diversas formas. Por ejemplo, para detectar la presencia de MSLN en
una muestra. El anticuerpo también puede utilizarse para intentar unirse a MSLN e interrumpir
30 la interacción entre MSLN y MUC16.

En una modalidad preferida, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos
de longitud completa, que contienen una región Fc similar a las regiones Fc de tipo silvestre
que se unen a los receptores Fc.

Métodos terapéuticos

Los anticuerpos aquí proporcionados pueden administrarse para ralentizar o inhibir la progresión de un cáncer mesotelina-positivo, o inhibir la metástasis de un cáncer mesotelina-positivo. En estas aplicaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición se
5 administra a un sujeto en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento, la replicación o la metástasis de las células cancerosas, o para inhibir un signo o un síntoma del cáncer. Los sujetos adecuados pueden incluir aquellos diagnosticados con un cáncer que exprese mesotelina, como mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama
10 (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) o cáncer de ovario.

Se proporciona en el presente documento un método para tratar un cáncer mesotelina-positivo en un sujeto administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento. También se proporciona en el presente documento un método para inhibir la metástasis de un cáncer mesotelina-positivo en un sujeto
15 administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento. En algunas modalidades, el cáncer mesotelina-positivo es mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) o cáncer de ovario.

La administración de un anticuerpo descrito en el presente documento también puede ir acompañada de la administración de otros agentes anticancerígenos o tratamientos terapéuticos (como la resección quirúrgica de un tumor). Cualquier agente anticanceroso adecuado puede administrarse en combinación con los anticuerpos aquí descritos. Los
20 agentes anticancerígenos ejemplares incluyen, entre otros, agentes quimioterapéuticos, como, por ejemplo, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de la topoisomerasa, agentes antiproliferación, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas (por ejemplo, antiandrógenos) y agentes antiangiogénesis. Otros
25 tratamientos contra el cáncer son la radioterapia y otros anticuerpos dirigidos específicamente
30 contra las células cancerosas.

Otro tratamiento habitual para algunos tipos de cáncer es el quirúrgico, por ejemplo, la resección quirúrgica de un tumor metastásico. Otro ejemplo de tratamiento es la radioterapia, por ejemplo, la administración de material radiactivo o energía (como la radioterapia externa)

en la zona tumoral para ayudar a erradicar el tumor o reducir su tamaño antes de la resección quirúrgica.

Métodos de diagnóstico y detección

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

Se proporciona aquí un método para determinar si un sujeto tiene un cáncer mesotelina-positivo poniendo en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo monoclonal mesotelina-específico divulgado aquí; y detectando la unión del anticuerpo a la muestra. Un aumento de la unión del anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del anticuerpo a una muestra de control identifica al sujeto como portador de un cáncer mesotelina-positivo.

En otra modalidad, se proporciona un método para confirmar un diagnóstico de un cáncer mesotelina-positivo en un sujeto mediante el contacto de una muestra de un sujeto diagnosticado con un cáncer mesotelina-positivo con un anticuerpo monoclonal mesotelina-específico divulgado en el presente documento; y la detección de la unión del anticuerpo a la muestra. Un aumento de la unión del anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del anticuerpo a una muestra de control confirma el diagnóstico de un cáncer mesotelina-positivo en el sujeto.

En algunos ejemplos de los métodos divulgados, el anticuerpo monoclonal se marca directamente.

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

positivo en el sujeto.

En algunos casos, el cáncer es mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo) o cáncer de ovario.

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

En algunas modalidades de los métodos de diagnóstico y detección, el anticuerpo anti-MSLN está marcado directamente con una etiqueta detectable. En otra modalidad, el anticuerpo anti-MSLN (el primer anticuerpo) no está marcado y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al primero está marcado. Como es bien sabido por un experto en la materia, se elige un anticuerpo secundario capaz de unirse específicamente a la especie y clase específicas del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el primer anticuerpo es una IgG humana, el anticuerpo secundario puede ser una IgG antihumana. Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen, sin limitación, la Proteína A y la Proteína G, ambas disponibles comercialmente.

Las etiquetas adecuadas para el anticuerpo o anticuerpo secundario incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes magnéticos y materiales radiactivos. Ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas son la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la acetilcolinesterasa. Ejemplos no limitantes de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Ejemplos no limitativos de materiales fluorescentes adecuados son la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la fluoresceína diclorotriazinilamina, el cloruro de dansilo o la ficoeritrina. Un material luminiscente ejemplar no limitante es luminol; un agente magnético ejemplar no limitante es gadolinio, y etiquetas radiactivas ejemplares no limitantes incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

En una modalidad alternativa, la mesotelina puede analizarse en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición utilizando estándares de proteína mesotelina marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-MSLN no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los estándares de proteína MSLN marcados y el anticuerpo anti-MSLN se combinan y se determina la cantidad de estándar de proteína MSLN marcado unido

al anticuerpo no marcado. La cantidad de MSLN en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de proteína MSLN marcada unida al anticuerpo anti-MSLN.

Los inmunoensayos y métodos aquí descritos pueden utilizarse para diversos fines.

- 5 En una modalidad, el anticuerpo anti-MSLN puede utilizarse para detectar la producción de MSLN en células en cultivo celular. En otra modalidad, el anticuerpo puede utilizarse para detectar la cantidad de MSLN en una muestra biológica, como una muestra de tejido, o una muestra de sangre o suero. En algunos ejemplos, el MSLN es MSLN de superficie celular. En otros ejemplos, la proteína MSLN es soluble (e.g. en un sobrenadante de cultivo celular o en
- 10 una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de sangre o suero).

- En una modalidad, se proporciona un kit para detectar MSLN en una muestra biológica, como una muestra de sangre o de tejido. Por ejemplo, para confirmar un diagnóstico de cáncer en un sujeto, se puede realizar una biopsia para obtener una muestra de tejido para su examen histológico. Los kits para detectar un polipéptido comprenderán típicamente un
- 15 anticuerpo monoclonal anti-MSLN, como cualquiera de los anticuerpos monoclonales divulgados en el presente documento. En otra modalidad, el anticuerpo está marcado (por ejemplo, con una etiqueta fluorescente, radiactiva o enzimática).

- En una modalidad, un kit incluye materiales de instrucción que divulgan los medios de uso de un anticuerpo anti-MSLN. El material didáctico puede ser escrito, en formato
- 20 electrónico (como un disquete informático o un disco compacto) o visual (como archivos de vídeo). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación concreta para la que está diseñado el kit. Así, por ejemplo, el kit puede contener además medios para detectar una etiqueta (como sustratos enzimáticos para etiquetas enzimáticas, juegos de filtros para detectar etiquetas fluorescentes, etiquetas secundarias apropiadas
- 25 como un anticuerpo secundario, o similares). Los kits pueden incluir además tampones y otros reactivos utilizados habitualmente para la práctica de un método concreto. Tales kits y sus contenidos apropiados son bien conocidos por los expertos en la materia.

- En una modalidad, el kit de diagnóstico comprende un inmunoensayo. Aunque los detalles de los inmunoensayos pueden variar con el formato particular empleado, el método
- 30 de detección de MSLN en una muestra biológica generalmente incluye los pasos de contactar la muestra biológica con un anticuerpo anti-MSLN. Se permite que el anticuerpo se una específicamente en condiciones inmunológicamente reactivas para formar un inmunocomplejo, y la presencia del inmunocomplejo (anticuerpo unido) se detecta directa o

indirectamente.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden utilizarse en inmunoensayos, como, por ejemplo, radioinmunoensayos (RIA), ELISA o ensayos inmunohistoquímicos. Los anticuerpos también pueden utilizarse para la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). FACS emplea una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, y canales de impedancia, entre otros niveles más sofisticados de detección, para separar o clasificar las células (véase la patente estadounidense No. 5.061.620). En estos ensayos se puede utilizar cualquiera de los anticuerpos monoclonales que se unen a la mesotelina, según se divulga en el presente documento. Así, los anticuerpos pueden utilizarse en un inmunoensayo convencional, incluyendo, sin limitación, un ELISA, un RIA, FACS, inmunohistoquímica tisular, Western blot o inmunoprecipitación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Esquemas de vacunación animal

Para obtener anticuerpos específicos de MSLN, se inmunizó a ratones transgénicos Harbour H2L2 (<https://harbourantibodies.com/>) mediante diferentes enfoques. Estas inmunizaciones produjeron una serie de anticuerpos que se unen a las proteínas extracelulares (ECD) de MSLN y a las células que expresan MSLN, como las células COV644 (una línea celular de carcinoma epitelial mucinoso de ovario que expresa MSLN).

En concreto, la proteína recombinante humana MSLN ECD His-tag (Acro Biosystem, Catálogo # MSN-H5223) o la proteína recombinante cynomolgus MSLN ECD His-tag (con la secuencia establecida a continuación, SEQ ID NO: 77) se utilizó como inmunógeno para inmunizar a los ratones transgénicos Harbour H2L2.

Proteína ECD His-tag de MSLN de Cynomolgus (SEQ ID NO: 77)

DVERTTCPPEKEVHEIDESLIFYKKRELEACVDAALLAAQMDRVD AIPFTYEQLDV LK
HKLDELYPQGYPESVIRHLGHLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLKVSKGHEMSAQVATLID
RVVVGRGQLDKDVTDLTAFCPGCLCSLSPERLSSVPPSVIGAVRPQDLDT CGPRQLDVLYP
KARLAFQNMSGSEYFVKIRPFLGGAPTEVDKALSQQNVSMDLATFMKLRREAVLPLTVAEVQ
KLLGPHVEGLKVEEQHSPVRDWILKQRQDDLDLGLGLQG GIPNGYLILDL SVREALSGTPC
LLGPGPVLTVLALLASHHHHHH

El esquema para generar anticuerpos anti-mesotelina mediante inmunización antigénica y cribado de clones de hibridoma se ilustra en la FIG. 1.

En la tabla 6 a continuación, se ofrece un ejemplo de esquemas de inmunización. En resumen, a cada ratón se le administraron 50 µg del inmunógeno para el primer refuerzo y 25 µg para los refuerzos siguientes por vía s.c. o i.p. junto con adyuvante (Sigma, S6322). La inmunización se realizó quincenalmente durante un total de 6 veces. La inmunización final se realizó con inmunógeno diluido en PBS vía i.p. Se analizaron los títulos séricos frente a la proteína humana recombinante MSLN ECD His-tag (Acro Biosystem, Catálogo # MSN-H5223) mediante ELISA y FACS.

Tabla 6. esquemas de inmunización

Inmunógeno	Tamaño del grupo de animales	Cepa	Ruta	Adyuvante
HuMSLN, proteína his	G1, N=10	H2L2	i.p. (250µL)	CFA/RIBI/RIBI/RIBI/RIBI/RIBI
cynoMSLN, proteína his	G3, G5, N=5	H2L2	i.p. (250µL)	CFA/RIBI/RIBI/RIBI/RIBI/RIBI

Ejemplo 2. Detección de anticuerpos específicos de MSLN

2.1 generación de hibridomas y cribado de anticuerpos específicos de MSLN

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas suelen ser células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de roedor. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Los sobrenadantes de anticuerpos producidos por las células de hibridoma

pueden analizarse para determinar la especificidad de unión a la MSLN diana mediante ensayos in vitro, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Una vez identificadas las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos estándar. (Véase Goding, 5 Anticuerpos monoclonales: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103).

2.2 cribado de células B individuales para anticuerpos específicos de MSLN

Se utilizó el sistema optofluídico Beacon® para el cribado de células B individuales. El sistema utiliza la tecnología de posicionamiento óptico-eléctrico (OEPTM, por sus siglas en inglés) para mover células individuales, y permite realizar simultáneamente pruebas de 10 función biológica, análisis experimentales, selección positiva de clones y otras operaciones en condiciones de cultivo celular. La plataforma Beacon puede realizar estas tareas de forma masiva, paralela y automatizada en miles de células.

En este ejemplo, se utilizó un flujo de trabajo de descubrimiento de células plasmáticas. En cada experimento, se examinaron hasta 14.000 células plasmáticas individuales para 15 detectar la secreción de anticuerpos específicos de MSLN. A continuación, las células plasmáticas que secretaban anticuerpos específicos contra antígenos se transfirieron a placas de 96 pocillos para la posterior secuenciación de células B individuales con el fin de identificar la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo producido por una única célula B (monoclonal). FIG. 2 muestra la estrategia y el proceso de cribado.

En el ejemplo se utilizó un método de secuenciación de una sola célula B para obtener 20 las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo a partir de una sola célula plasmática. Los procedimientos generales incluyen la extracción y purificación del ARN total a partir de un lisado de células plasmáticas individuales, la síntesis por transcripción inversa del ADNc, la amplificación y purificación del ADNc, la amplificación de las secuencias 25 de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, la clonación y transfección, y la secuenciación Sanger. Se realizó un análisis de unicidad y de agrupamiento de las secuencias obtenidas y, a continuación, se sintetizaron las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera emparejadas del anticuerpo.

Ejemplo 3. Producción y purificación de anticuerpos

Los plásmidos recombinantes que codifican los anticuerpos diana se transfectaron 30 transitoriamente en células HEK293-6E o 293-F utilizando PEI (Polyscience, 24885). Tras la

transfección, las células se incubaron a 37 °C con un 5 % de CO₂ y agitación a 120 rpm. Los sobrenadantes de cultivos celulares que contenían anticuerpos diana se recogieron 6-7 días después de la transfección mediante centrifugación y filtración. Los anticuerpos monoclonales se purificaron utilizando perlas magnéticas de proteína A (AmMag Protein A Magnetic Beads, Genscript, L00695).

La pureza de los anticuerpos se comprobó mediante SEC-HPLC (HPLC Agilent 1260 Infinity II con Welch Xtimate SEC-300 Colum, 1 X PBS pH 7,4 como fase móvil) y SDS-PAGE (SurePAGE, Bis-Tris, 10x8, 4-12 %, 12 pocillos, Genscript, M00653). Los anticuerpos recombinantes se expresaron y purificaron con éxito para su posterior caracterización.

Se obtuvieron los dos anticuerpos PR300159 y PR300186. Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos PR300159 y PR300186 se enumeran en las Tablas 1 a 4 anteriores.

Mientras tanto, también se produjo el anticuerpo anti-MSLN Amatuximab siguiendo los procedimientos mostrados anteriormente con información de secuencia de IMGT (<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=9343>). Este anticuerpo se utilizó como control en estudios posteriores y se le asignó el código PR000685.

Ejemplo 4. Actividad de unión de los anticuerpos a las células que expresan MSLN

La unión de anticuerpos recombinantes anti-MSLN a células humanas o de cynomolgus que expresan MSLN se comprobó mediante citometría de flujo. En este ejemplo, las líneas celulares que expresan MSLN son líneas celulares CHOK1 transfectadas para expresar MSLN humana (CHOK1-hu MSLN, proveedor: Kyinno, catálogo: KC-1152) o MSLN de cynomolgus (CHOK1-cyno MSLN, vendedor: Kyinno, catálogo: KC-1174), así como la línea celular COV644 (ECACC, catálogo: 07071908) en la superficie.

En resumen, los anticuerpos anti-MSLN se diluyeron en serie en tampón de tinción (PBS con un 2 % de FBS). Se añadieron 50 µL de solución diluida de anticuerpo a 50 µL de suspensión celular que contenía $1-2 \times 10^5$ células y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con tampón de tinción (PBS con un 2 % de FBS) y se añadieron a cada pocillo 100 µL de anticuerpo IgG antihumano marcado con fluorescencia diluido 1:1000 (Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Human IgG(H+L), Jackson ImmunoResearch, Catálogo 109-545-088). Tras 1 hora de incubación a 4 °C, las células se lavaron dos veces

con tampón de tinción y se sometieron a citometría de flujo. El PR000685 (Amatuximab) y el control de isotipo IgG no relevante (Crownbio) se utilizaron como controles positivo y negativo respectivamente.

Los resultados se muestran en las FIG. 3 a FIG. 5 abajo. Los resultados indican que tanto PR300159 como PR300186 mostraron una fuerte actividad de unión a células que expresan MSLN humanas y de cynomolgus, con valores de EC50 comparables a PR000685 (Amatuximab). Estos resultados indican que los anticuerpos anti-MSLN PR300159 y PR300186 son capaces de unirse a MSLN humano y de cynomolgus en la membrana celular con alta afinidad.

Ejemplo 5. Ingeniería de anticuerpos

Las secuencias VH y VL de los anticuerpos anti-MSLN PR300159 y PR300186 se optimizaron aún más mediante el procedimiento de eliminación de PTM.

La modificación postraducciona (PTM, por sus siglas en inglés) se observa ampliamente en las proteínas expresadas en células de mamíferos. A excepción de los sitios PTM conservados en el anticuerpo, por ejemplo, el sitio de N-glicosilación conservado en el dominio CH2 del anticuerpo IgG1, otros sitios PTM ocurridos dentro de los sitios de unión al antígeno del anticuerpo (es decir, las regiones CDR) pueden reducir la actividad de unión al antígeno o reducir la estabilidad química. Por ejemplo, la desamidación o la isomerización pueden hacer que las moléculas sean inestables y heterogéneas. Para reducir la responsabilidad de la secuencia, los motivos PTM podrían eliminarse mediante mutaciones. Las secuencias VH o VL se escanearon por la presencia de motivos PTM, por ejemplo, motivos de isomerización (por ejemplo, DG). A continuación, el residuo "hotspot" (por ejemplo, D o G en el motivo DG) se mutó por el residuo homólogo en la secuencia de la línea germinal u otro residuo con propiedades biofísicas similares. Los anticuerpos compuestos por las variantes de secuencia tras la eliminación de PTM se produjeron entonces de forma recombinante mediante técnicas de biología molecular bien establecidas.

Las variantes diseñadas obtenidas a partir de la eliminación de PTM de PR300159 y PR300186 se mostraron en la Tabla 7. Las secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos anti-MSLN se mostraron en las Tablas 1 a 4. PR300159-1, PR300159-3, PR300159-4, PR300159-5, PR300159-6, PR300159-7, PR300159-8 y PR300159-9 eran anticuerpos sin PTM derivados de PR300159. PR300186-2, PR300186-3, PR300186-4, PR300186-5, PR300186-6, PR300186-7, PR300186-8, PR300186-9 y PR300186-10 eran anticuerpos sin

PTM derivados de PR300186.

Tabla 7. PR300159-derivado y PR300186-derivado variantes diseñadas.

Anticuerpo parental	Anticuerpo variante	Lugar de la mutación	Fc
PR300159	PR300159-1	Cadena pesada G33A y D54E cadena ligera N92S	hIgG1 Fc
	PR300159-3	cadena pesada G33A y G55A	hIgG1 Fc
	PR300159-4	cadena ligera S93A	hIgG1 Fc
	PR300159-5	cadena ligera N92Q	hIgG1 Fc
	PR300159-6	cadena ligera S93T	hIgG1 Fc
	PR300159-7	cadena ligera N92T	hIgG1 Fc
	PR300159-8	cadena ligera N92A	hIgG1 Fc
	PR300159-9	cadena pesada G33A y D54E cadena ligera S93A	hIgG1 Fc
PR300186	PR300186-2	cadena pesada N30Q	hIgG1 Fc
	PR300186-3	cadena pesada N30Q y N58Q	hIgG1 Fc

Anticuerpo parental	Anticuerpo variante	Lugar de la mutación	Fc
	PR300186-4	cadena pesada N30Q y N58Q cadena ligera N30Q	hIgG1 Fc
	PR300186-5	cadena ligera N30Q	hIgG1 Fc
	PR300186-6	cadena pesada N30Q y S59A	hIgG1 Fc
	PR300186-7	cadena pesada N30Q cadena ligera S31A	hIgG1 Fc
	PR300186-8	cadena pesada N30Q y S59A cadena ligera S31A	hIgG1 Fc
	PR300186-9	cadena ligera S31A	hIgG1 Fc
	PR300186-10	cadena pesada N30Q y N58Q cadena ligera S31A	hIgG1 Fc

Ejemplo 6. Actividad de unión de anticuerpos contra la proteína MSLN humana y de cynomolgus

Se diluyó MSLN humana (Acro Biosystems, Catálogo # MSN-H5223) o proteína MSLN de cynomolgus (Harbourbiomed, lote:2019072202) en PBS hasta una concentración de 1 µg/mL. Se añadieron 100 µL de MSLN humana diluida o MSLN de cynomolgus por pocillo a microplacas ELISA, y las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con solución de bloqueo ELISA (que contenía 2 % p/v de BSA, 0,05 % (v/v) de tween-20, tampón PBS de pH 7,4 tampón PBS) a 37 °C durante 1 hora, a continuación, se lavaron las placas y se incubaron con anticuerpos anti-MSLN diluidos (PR300186, PR300186-2, PR300186-3, PR300186-4, PR300186-5, PR300186-6, PR300186-7, PR300186-8,

PR300186-9, y PR300186-10) a 15 µg/mL (100 nM, 10 diluidos, 8 puntos) durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se lavaron las placas y se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana de cabra (H+L) conjugado con HRP (Jackson, Cat: 109-035-088) a 37 °C durante 1 hora. 100 µL de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Biopanda, Cat: TMB-S-003) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos. 100 µL de solución de parada ELISA (Solarbio, Cat#: C1058) para terminar la reacción, y se determinó la densidad óptica a 450 nm (OD450nm) mediante un lector de placas ELISA (Molecular Devices, Spectra max 384 plus).

Los resultados para los anticuerpos de eliminación de PTM PR300186 y PR300186 (PR300186-2, PR300186-3, PR300186-4, PR300186-5, PR300186-6, PR300186-7, PR300186-8, PR300186-9 y PR300186-10) se muestran en la FIG. 6, FIG. 7 y Tabla 8. Los resultados indican que todos los anticuerpos de eliminación de PTM derivados del PR300186 mostraron una buena actividad de unión a la proteína MSLN humana y de cynomolgus, con valores de EC50 comparables a los del PR300186.

Tabla 8. Unión de los anticuerpos PR300186 de eliminación de PTM a la proteína MSLN humana y a la proteína cyno MSLN

Anticuerpo	MSLN humano		Cyno MSLN	
	EC50 (nM)	Span	EC50 (nM)	Span
PR300186	0,12	3,42	0,05	2,33
PR300186-2	0,14	3,36	0,05	2,43
PR300186-3	0,10	3,25	0,05	2,36
PR300186-4	0,18	3,47	0,07	2,53
PR300186-5	0,22	3,61	0,07	2,70

Anticuerpo	MSLN humano		Cyno MSLN	
PR300186-6	0,21	3,66	0,07	2,67
PR300186-7	0,14	3,85	0,04	2,24
PR300186-8	0,13	3,87	0,04	2,18
PR300186-9	0,11	3,85	0,05	2,19
PR300186-10	0,10	3,71	0,04	2,19

Ejemplo 7. Actividad de unión de anticuerpos a células que expresan MSLN

Unión de anticuerpos recombinantes anti-MSLN a la línea celular COV644 (ECACC, catálogo: 07071908) se analizó mediante citometría de flujo. En resumen, los anticuerpos anti-MSLN se diluyeron en serie en tampón de tinción (PBS con un 2 % de FBS). Se añadieron 50 μ L de solución diluida de anticuerpo a 50 μ L de suspensión celular que contenía $1-2 \times 10^5$ células y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con tampón de tinción (PBS con un 2 % de FBS) y se añadieron a cada pocillo 100 μ L de anticuerpo IgG antihumano marcado con fluorescencia diluido 1:1000 (Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Human IgG(H+L), Jackson ImmunoResearch, Catálogo 109-545-088). Tras 1 hora de incubación a 4 °C, las células se lavaron dos veces con tampón de tinción y se sometieron a citometría de flujo.

Los resultados para los anticuerpos de eliminación de PTM PR300159 se muestran en la FIG. 8 y Tabla 9 a continuación. Los resultados indican que los anticuerpos de eliminación de PTM PR300159-1, PR300159-3, PR300159-5, PR300159-6 y PR300159-8 mostraron una actividad de unión comparable a las células COV644 en comparación con PR300159.

Tabla 9. Unión de anticuerpos PR300159 de eliminación de PTM a MSLN de superficie celular mediante FACS

Anticuerpo	COV644	
	EC50 (nM)	TOP (IMF)
PR300159	1,99	2072495
PR300159-1	1,64	2340478
PR300159-3	2,14	2062034
PR300159-5	2,75	2127765
PR300159-6	4,07	2189544
PR300159-8	2,33	2153079
PR300159-9	8,25	1561284

Los resultados para los anticuerpos de eliminación de PTM derivados de PR300186 se muestran en las FIG. 9. Los resultados indican que los anticuerpos de eliminación de PTM PR300186-3, PR300186-9 y PR300186-10 mostraron una mejor actividad de unión a las células COV644 en comparación con PR300186.

Ejemplo 8. Internalización de anticuerpos por células que expresan MSLN

En este ejemplo, se utilizó el colorante pHAb Amine Reactive Dye (Promega, Cat # G9841) para determinar la internalización basada en antígenos de anticuerpos anti-MSLN en células COV644. Los colorantes pHAb son colorantes sensores de pH que tienen una fluorescencia muy baja a pH > 7 y un aumento drástico de la fluorescencia cuando la solución se vuelve ácida. Cuando un anticuerpo marcado con colorantes pHAb se une al exterior de la

membrana de las células en pH neutro, se puede monitorizar una fluorescencia nula o muy baja. Tras la internalización, la fluorescencia se hará más intensa en entornos de pH más bajo en endosomas y lisosomas.

Los anticuerpos se marcaron con colorantes pHAb y se calcularon los DAR siguiendo las instrucciones del kit. A continuación, los anticuerpos marcados se incubaron con COV644 a 4 °C (la actividad de internalización a esta temperatura es muy baja, por lo que se utilizó como control de fondo) o 37 °C durante 24 horas. A continuación, se detectó una fluorescencia con máximos de excitación (Ex) a 532 nm y de emisión (Em) a 560 nm. Los resultados finales normalizados se muestran como la intensidad de fluorescencia bajo 37 °C restando la intensidad de fluorescencia en el fondo bajo 4 °C y luego se dividen por DARs de tinte pHAb del anticuerpo. Un valor más alto indica una mayor actividad de internalización.

Los resultados de la tasa de internalización de PR300159 y los anticuerpos de eliminación de PTM derivados de PR300159 se muestran en la FIG. 10 y Tabla 10. Los resultados indican que los anticuerpos PR300159-1, PR300159-4, PR300159-5, PR300159-6, PR300159-7, PR300159-8 muestran una internalización comparable por las células COV644 en comparación con PR300159.

Los resultados de la tasa de internalización de PR300186 y los anticuerpos de eliminación de PTM derivados de PR300186 se muestran en FIG. 11 y Tabla 10. Los resultados indican que PR300186-3, PR300186-9 y PR300186-10 muestran una mejor internalización por las células COV644 en comparación con PR300186.

Tabla 10. Internalización de los anticuerpos PR300159 y PR300186 de eliminación de PTM por células que expresan MSLN

Anticuerpo	Internalización
	FLU
PR300159	22214
PR300159-1	13720

Anticuerpo	Internalización
PR300159-3	9180
PR300159-4	20888
PR300159-5	20912
PR300159-6	17753
PR300159-7	22440
PR300159-8	21172
PR300159-9	8299
PR300186	6049
PR300186-3	7042
PR300186-9	8069
PR300186-10	8219

Ejemplo 9. Actividad de unión de anticuerpos a la proteína soluble MSLN por el método BLI

En el ejemplo, se analizó la cinética de unión de los anticuerpos anti-MSLN a MSLN soluble mediante Octet Red384 (Fortebio). En el análisis de interferometría de biocapa (BLI), la etiqueta MSLN-His humana recombinante (Acro Biosystems, # de catálogo MSN-H5223) se diluyó en serie con tampón cinético 1× (Fortebio). Los anticuerpos anti-MSLN se diluyeron

a 5 µg/mL. A continuación, los anticuerpos diluidos, el antígeno y el tampón de regeneración (10 mM de glicina pH 1,75) se añadieron a placas de 96 pocillos (Greiner). Las constantes de velocidad de asociación y disociación se midieron utilizando un sensor AHC (Fortebio). La superficie del sensor se regeneró después de cada experimento de unión con tampón de regeneración. Las trazas se procesaron con el software de análisis de datos Octet (versión 11.0, Pall ForteBio, CA, EE.UU.). Los valores K_D de la unión de los anticuerpos contra MSLN humana soluble se resumen en la Tabla 11.

Como se muestra en la Tabla 11, en el análisis Octet, los anticuerpos de eliminación de PTM derivados de PR300159 mostraron una afinidad de unión comparable a MSLN soluble en comparación con PR300159.

Los PR300186 y PR300186-10 muestran una baja afinidad de unión a MSLN soluble, lo que resulta ventajoso cuando se aplican como anticuerpos terapéuticos, ya que los anticuerpos se unirían preferentemente a MSLN de superficie celular en células tumorales en lugar de a MSLN soluble en el sistema circulatorio.

Tabla 11. Unión de los anticuerpos de eliminación de PTM PR300159 y PR300186 a MSLN humana soluble

Anticuerpo	Afinidad de octetos		
	KD (M)	kon(1/Ms)	R ² completa
PR300159	9,65E-12	1,28E+06	0,9977
PR300159-1	<1,0E-12	9,47E+05	0,9974
PR300159-3	<1,0E-12	8,28E+05	0,9919
PR300159-4	<1,0E-12	9,78E+05	0,9975
PR300159-5	<1,0E-12	1,05E+06	0,9965

Anticuerpo	Afinidad de octetos		
	KD (M)	kon(1/Ms)	R^2 completa
PR300159-6	<1,0E-12	8,19E+05	0,99
PR300159-7	<1,0E-12	1,06E+06	0,9973
PR300159-8	<1,0E-12	9,56E+05	0,9934
PR300159-9	<1,0E-12	5,66E+05	0,9706
PR300186	1,86E-08	7,05E+05	0,93
PR300186-10	1,28E-07	4,31E+05	0,99

Ejemplo 10. Ensayo de interferencia de MSLN soluble

Los anticuerpos que unen la forma de MSLN unida a la membrana son ventajosos para fines diagnósticos y terapéuticos. Como no se unen a la MSLN soluble, tendrán un fondo más bajo para aplicaciones de imagen, y podrán utilizarse a una dosis más baja para usos terapéuticos.

Se probaron los anticuerpos PR300159 y PR300186 y los anticuerpos de eliminación de PTM derivados de PR300159-8 o PR300186-10 para comprobar su unión a COV644 que expresa mesotelina en presencia o ausencia de 90 nM de MSLN soluble (sMSLN). Los experimentos se realizaron siguiendo un procedimiento similar al mostrado en el Ejemplo 4, excepto que se añadieron 90nM de MSLN soluble a los anticuerpos diluidos en serie para los grupos +sMSLN.

Como se muestra en las FIG. 12, la unión de PR300159 a las células COV644 disminuyó en presencia de 90 nM de MSLN soluble en comparación con sin MSLN soluble. Como se muestra en la FIG. 13, el PR300186 mostró menos cambios, lo que indicaba una

menor interferencia del MSLN soluble en la unión del PR300186 a la forma de MSLN unida a la membrana.

5 Como se muestra en la FIG. 14 y FIG. 15, la unión de PR300159-8 y PR300186-10 a células COV644 disminuyó en presencia de 90nM de MSLN soluble en comparación con sin MSLN soluble. Sin embargo, el PR300186-10 mostró menos cambios, lo que indicaba una menor interferencia de la MSLN soluble en la unión de estos anticuerpos a la forma de MSLN unida a la membrana.