



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0819909-4 B1



(22) Data do Depósito: 19/11/2008

(45) Data de Concessão: 20/04/2021

(54) Título: ANTICORPO SINTÉTICO HUMANO OU HUMANIZADO ISOLADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO, FRAGMENTO FUNCIONAL E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/30; A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 26/11/2007 US 61/004,378.

(73) Titular(es): BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH.

(72) Inventor(es): ANTJE KAHNERT; DAVID LIGHT; DOUG SCHNEIDER; RENATE PARRY; NOBORU SATOZAWA; TARA RENEE HEITNER HANSEN; STEFAN STEIDL; ULRIKE SCHUBERT.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008009756 de 19/11/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/068204 de 04/06/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/05/2010

(57) Resumo: ANTICORPOS ANTIMESOTELINA E USOS DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a regiões ao antígeno recombinantes e anticorpos e fragmentos funcionais contendo tais regiões de ligação ao antígeno que são específicas para o polipeptídeo mesotelina de 40kDa fixado à membrana que é superexpresso em diversos tumores, como tumores pancreáticos e ovarianos, mesotelioma e células de câncer pulmonar. Esses anticorpos, consequentemente, podem ser usados para tratar essas e outras doenças e condições. Os anticorpos da invenção também podem ser usados no campo de diagnóstico, bem como para investigação adicional da função de mesotelina na progressão de doenças associadas ao câncer. A invenção também fornece sequências de ácido nucleico que codificam os anticorpos anteriormente mencionados, vetores contendo os mesmos, composições farmacêuticas e kits com instruções para uso.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**“ANTICORPO SINTÉTICO HUMANO OU HUMANIZADO ISOLADO
OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO, FRAGMENTO
FUNCIONAL E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”.**

[0001] A presente invenção refere-se a regiões de ligação ao antígeno recombinantes e anticorpos e fragmentos funcionais contendo tais regiões de ligação ao antígeno que são específicas para o polipeptídeo de mesotelina fixado à membrana de 40 kDa, esse é superexpresso em vários tumores, como tumores pancreáticos e ovarianos, mesotelioma e células cancerígenas de pulmão. Esses anticorpos, conseqüentemente, podem ser usados para tratar essas e outras doenças e condições. Os anticorpos da invenção também podem ser usados no campo de diagnóstico bem como para investigação adicional da função de mesotelina na progressão de doenças associadas ao câncer. A invenção também proporciona sequências de ácido nucleico que codificam os anticorpos anteriormente mencionados, vetores contendo os mesmos, composições farmacêuticas e kits com instruções para uso.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Foi verificado que a terapia baseada em anticorpo é muito eficaz no tratamento de vários cânceres, inclusive tumores sólidos. Por exemplo, HERCEPTIN® foi usado de forma bem-sucedida para tratar câncer de mama. Para o desenvolvimento de uma terapia bem-sucedida baseada em anticorpo realiza-se o isolamento de anticorpos contra proteínas de superfície celular consideradas como preferencialmente expressas em células tumorais. O polipeptídeo precursor de mesotelina é uma proteína de superfície celular glicosilada fixada a glicofosfatidilinositol (GPI) que é proteoliticamente clivada com um polipeptídeo secretado N-terminal de 30 kDa e um polipeptídeo C-terminal de 40 kDa, que ocorre predominantemente na forma fixada a

GPI ligada à membrana (Chang, K. e I. Pastan, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, (1996) 93(1): 136), e que é denominada mesotelina aqui. A mesotelina é, de preferência, expressa por determinadas células tumorais, particularmente células de mesotelioma, células de tumor pancreático e células de carcinoma ovariano, visto que sua expressão é limitada em tecido normal, tornando-a um alvo ideal para terapia de tumores (Argani, P. et al, Clin. Cancer Res.(2001) 7(12): 3862; Hassan, R., et al, Clin. Cancer Res. (2004) 10(12 Pt 1):3937). A função de mesotelina é desconhecida, e nenhuma anormalidade reprodutiva, hematológica, ou anatômica aparente foi observada em camundongos desprovidos de expressão genética de mesotelina (Bera, T.K. e I. Pastan, Mol. Cell. Biol. (2000) 20(8):2902).

[0003] A terapia dirigida baseada em anticorpo contra células cancerígenas de expressão de mesotelina foi proposta para o tratamento de câncer pulmonar, ovariano e pancreático. Mab K1 foi o primeiro anticorpo contra polipeptídeo de mesotelina ligado à membrana que foi descrito (Chang, K., et al, Int. J. Cancer, (1992) 50(3):373). Mab K1 foi gerado ao imunizar camundongos. Devido à baixa afinidade e taxas de internalização insatisfatórias do anticorpo, uma imunotoxina que consiste em Mab K1 ligado a uma forma truncada quimicamente modificada de exotoxina A de *Pseudomonas* não foi considerada adequada para desenvolvimento clínico (Hassan, R., et al, J. Immunother. (2000) 23(4):473; Hassan, R., et al, Clin. Cancer Res. (2004) 10(12 Pt 1): 3937). Subsequentemente, os anticorpos de cadeia simples com afinidades superiores foram desenvolvidos, inclusive SS1-(dsFv)-PE38, esses mostraram atividade exterminadora de células tumorais *in vitro* (Hassan, R., et al, Clin. Cancer Res. (2002) 8(11): 3520) bem como potência em um modelo murino de tumores de expressão de mesotelina humanos (Fan, D., et al, Mol. Cancer Ther. (2002) 1(8): 595). Esses dados validam a mesotelina como um alvo adequado para

imunoterapia de vários cânceres. Entretanto, em testes clínicos, SS1-(dsFv)-PE38 era imunogênico, impedindo uma segunda administração da maioria dos pacientes. Ademais, SS1-(dsFv)-PE38 foi mostrado com uma rápida depuração sanguínea e tentativas foram relatadas para aumentar o peso molecular através da peguilação da proteína de fusão (Filpula, D., et al, Bioconjugate Chem. (2007) 18(3): 773).

[0004] MS-1, MS-2 e MS-3 são anticorpos de ligação à mesotelina que produzem atividade efectora imune na superfície celular devido ao seu isotipo IgG1 humano e são internalizados dentro de células de expressão de mesotelina (WO 2006/099141 A2). Um dos mesmos anticorpos, o anticorpo antimesotelina MOR Ab 009 IgG não-conjugado foi atualmente testado em um teste clínico para efeitos terapêuticos no tratamento de câncer pancreático.

[0005] O valor preditivo de modelos de câncer murinos de xenoenxerto para resultado clínico de terapia de câncer com imunotoxina é geralmente limitado por uma falta de reatividade cruzada dos anticorpos terapêuticos com seus homólogos murinos, resultando em ligação não-específica reduzida ao tecido normal. Por outro lado, a neutralização de anticorpos anticamundongos Fv que são formados em pacientes tratados com anticorpos murinos ou quiméricos pode resultar em toxicidade dose-limitante ou potência terapêutica reduzida. Assim, para explorar completamente o potencial de expressão de mesotelina específica em terapia de câncer, anticorpos-alvo são exigidos de modo a combinar as vantagens de afinidades aumentadas e taxas de dissociação reduzidas com um formato de cadeia variável completamente humano, e com reatividade cruzada de murinos.

[0006] Uma característica necessária adicional de novos anticorpos é a afinidade invariável a linhagens celulares de câncer diferentes que expressam mesotelina sobre sua superfície. A mesotelina é uma proteína altamente variável, que é submetida à digestão proteolítica

pós-traducional bem como à glicosilação em múltiplos locais (Hassan, R., et al, Clin. Cancer Res. (2004) 10(12 Pt 1): 3937). A variabilidade se estende ao nível transcricional, visto que três variantes de união diferentes foram detectadas, embora a variante de transcrição 1 (NM_005823) pareça representar as principais espécies presentes em linhagens celulares tumorais testadas até agora (Muminova, Z.E., et al, BMC Cancer (2004) 4:19; Hellstrom, L, et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. (2006) 15(5):1014). Assim, os anticorpos antimesotelina eficazes devem se ligar a um epítipo de maneira invariável apresentado por células tumorais de pacientes diferentes, independentemente de variância individual inclusive, porém sem caráter limitativo, variâncias em padrões de glicosilação, resultando na expressão de formas diferentes de mesotelina.

[0007] Proporcionam-se aqui anticorpos, fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos, que se ligam à mesotelina com afinidade alta e invariável, se internalizam de maneira eficaz, e são, de preferência, de reatividade cruzada com mesotelina de outra espécie. Também são proporcionadas terapias baseadas em anticorpo para câncer, em particular para tumores que expressam mesotelina, por exemplo, câncer pancreático, ovariano, ou pulmonar, utilizando anticorpos, fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos, que facilitam a aplicação de agentes terapeuticamente ativos a células cancerígenas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0008] Um objetivo da invenção é proporcionar anticorpos humanos e humanizados, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos, que são altamente seletivos para a parte extracelular C-terminal de 40 kDa do polipeptídeo precursor de mesotelina, e que podem ser empregados em métodos de detecção de expressão de mesotelina, que está associada aos estados de doença

como câncer do pâncreas, ovário, e pulmão, e no tratamento de tais estados de doença. Com isso, um objetivo da invenção é proporcionar anticorpos humanos isolados, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, que se ligam especificamente a um epitopo presente no polipeptídeo de mesotelina (SEQ ID NO:370), que é invariavelmente apresentado por linhagens celulares de câncer de expressão de mesotelina, e que é ligado por esses anticorpos com afinidades comparáveis. Como usado aqui, o termo "apresentação invariável" do epitopo refere-se à presença de um epitopo identificado por um anticorpo particular em uma ampla gama de linhagens celulares de tumor de expressão de mesotelina que expressam formas diferentes de mesotelina. Como usado aqui, "formas" diferentes de mesotelina incluem, porém sem caráter limitativo, glicoformas diferentes, isoformas diferentes ou polipeptídeos de mesotelina que são submetidos a modificações traducionais e pós-traducionais diferentes. Como usado aqui, o termo "afinidades comparáveis" refere-se a valores de metade da potência máxima de anticorpo (EC50) obtidos por Análise de Scatchard de dados FACS de ligação de anticorpo a células que expressam formas diferentes de mesotelina, que não se diferem em mais de 10 fatores, ou, de preferência, 5 fatores, ou, ainda de preferência, 2 fatores.

[0009] Outro objetivo da invenção é proporcionar anticorpos, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos que são seguros para administração em humanos.

[00010] Outro objetivo da invenção é proporcionar anticorpos, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos, que se ligam à mesotelina humana e são de reatividade cruzada com mesotelina de outra espécie. De preferência, a dita outra espécie é um roedor, como, por exemplo, camundongo ou

rato. Com mais preferência, os anticorpos, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos se ligam à mesotelina humana e são de reatividade cruzada com mesotelina murina. Outro objetivo da invenção é proporcionar anticorpos, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos, que se ligam invariavelmente a diferentes linhagens celulares de expressão de mesotelina com afinidade comparável. Como usado aqui, o termo "ligação invariável" de um anticorpo particular à mesotelina refere-se à sua capacidade de se ligar à mesotelina em uma ampla gama de linhagens celulares de câncer de expressão de mesotelina que expressam formas diferentes de mesotelina. A ligação invariável pode ser causada, porém sem caráter limitativo, pelo fato de que os anticorpos, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos, identificam um epitopo de mesotelina que não é mascarado por outro antígeno extracelular, como antígeno de câncer 125 (CA 125), que interage com mesotelina.

[00011] Outro objetivo da invenção é proporcionar anticorpos ou variante dos mesmos, que se ligam a células cancerígenas de expressão de mesotelina diferentes ou células tumorais e produzem a atividade efetora imune (por exemplo, ADCC ou CDC) contra células cancerígenas de expressão de mesotelina, utilizando um ou mais anticorpos ou variantes dos mesmos, da invenção.

[00012] Outro objetivo da invenção é proporcionar anticorpos, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos, que são internalizados após a ligação a uma célula de expressão de mesotelina. Também outro objetivo da presente invenção é proporcionar métodos de tratamento de doenças mediante a aplicação de fármacos citotóxicos ou enzimas de liberação de fármaco às células cancerígenas de expressão de mesotelina, utilizando um ou

mais anticorpos, ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, ou variantes dos mesmos, da invenção.

[00013] Outro objetivo da invenção é proporcionar anticorpos que constituem uma ferramenta para o diagnóstico de condições malignas ou displásicas onde a expressão de mesotelina é elevada comparada com o tecido normal. São proporcionados anticorpos antimesotelina conjugados com um marcador detectável. Os marcadores preferidos consistem em um radiomarcador, uma enzima, um cromóforo ou um fluorescedor.

[00014] A invenção também está relacionada a polinucleotídeos que codificam os anticorpos da invenção, as células que expressam os anticorpos da invenção, métodos de produção dos anticorpos da invenção, métodos de inibição do crescimento de células displásicas utilizando os anticorpos, e métodos de tratamento e detecção de câncer utilizando os anticorpos.

[00015] A invenção proporciona anticorpos que são distinguidos de Mab K1, SS1, MS-1, MS-2 e MS-3 pelo fato de que esses a) se ligam invariavelmente à mesotelina b) são de reatividade cruzada com mesotelina murina c) se ligam à mesotelina com afinidades inferiores d) são internalizados de maneira eficaz dentro de células de expressão de mesotelina, e e) contêm regiões variáveis humanas.

[00016] Esses e outros objetivos da invenção são mais completamente descritos aqui.

[00017] Em um aspecto, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo funcional que contém uma região de ligação ao antígeno que é específica para um epitopo do polipeptídeo de mesotelina de 40 kDa.

[00018] Tal anticorpo ou fragmento funcional do mesmo pode conter uma região de ligação ao antígeno que contém uma região H-CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 67-98; a região de ligação ao antígeno pode

incluir ainda uma região H-CDR2 mostrada na SEQ ID NO:31-66; e a região de ligação ao antígeno também pode conter uma região H-CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 1-30. Tal anticorpo específico de mesotelina da invenção pode conter uma região de ligação ao antígeno que contém uma região L-CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 160- 197; a região de ligação ao antígeno pode incluir ainda uma região L-CDR1 mostrada na SEQ ID NO:99-128; e a região de ligação ao antígeno também pode conter uma região L-CDR2 mostrada na SEQ ID NO:129-159.

[00019] As variantes peptídicas das sequências mostradas aqui também são adotadas pela presente invenção. Consequentemente, a invenção inclui anticorpos antimesotelina que possuem uma sequência de aminoácido de cadeia pesada com: pelo menos 60 por cento de identidade de sequência nas regiões CDR com as regiões CDR mostradas na SEQ ID NO:1- 197 ; e/ou pelo menos 80 por cento de homologia de sequência nas regiões CDR com as regiões CDR mostradas na SEQ ID NO: 1-197. Adicionalmente incluídos estão os anticorpos antimesotelina que possuem uma sequência de aminoácido de cadeia leve com: pelo menos 60 por cento de identidade de sequência nas regiões CDR com as regiões CDR mostradas na SEQ ID NO: 1-197; e/ou pelo menos 80 por cento de homologia de sequência nas regiões CDR com as regiões CDR mostradas na SEQ ID NO: 1-197.

[00020] Um anticorpo da invenção pode ser um IgG (por exemplo, IgG1), enquanto um fragmento de anticorpo pode ser um Fab ou scFv, por exemplo. Um fragmento de anticorpo inventivo, consequentemente, pode ser, ou pode conter, uma região de ligação ao antígeno que se comporta de uma ou mais maneiras, como descrito aqui.

[00021] A invenção também está relacionada a sequências de ácido nucleico isoladas, sendo que cada uma pode codificar uma região de ligação ao antígeno de um anticorpo humano ou fragmento funcional do mesmo que é específico para um epítipo de mesotelina. Tal sequência

de ácido nucleico pode codificar uma cadeia pesada variável de um anticorpo e incluir uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS 284-326: ou uma sequência de ácido nucleico que é hibridizada sob condições de alta estringência com a cadeia complementar de SEQ ID NO: 284-326. O ácido nucleico deve codificar uma cadeia leve variável de um anticorpo isolado ou fragmento funcional do mesmo, e pode conter uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 327-369, ou uma sequência de ácido nucleico que é hibridizada sob condições de alta estringência com a cadeia complementar de SEQ ID NO: 327-369.

[00022] Os ácidos nucleicos da invenção são adequados para produção recombinante. Assim, a invenção também se refere a vetores e células hospedeiras que contêm uma sequência de ácido nucleico da invenção.

[00023] As composições da invenção podem ser usadas para aplicações terapêuticas ou profiláticas. A invenção, portanto, inclui uma composição farmacêutica que contém um anticorpo inventivo (ou fragmento de anticorpo funcional) e um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para tratar uma doença ou condição associada à presença indesejada de células de expressão de mesotelina. Tal método contém as etapas de administrar a um indivíduo necessitado do mesmo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica que contém um anticorpo inventivo como descrito ou contemplado aqui.

[00024] A invenção também fornece instruções para utilizar a biblioteca de anticorpos de modo a isolar um ou mais elementos de tal biblioteca que se ligam de maneira específica e invariável à mesotelina.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00025] A figura 1 mostra um agrupamento de epitopo de anticorpo

antimesotelina por análise de ligação em pares Biacore. A ligação competitiva de pares de anticorpos foi determinada ao imobilizar um anticorpo com o chip sensor, ao ligar a mesotelina solúvel a esse anticorpo e imediatamente ao ligar um segundo anticorpo à mesotelina. Os pares de anticorpos que identificam epítopos iguais ou sobrepostos em mesotelina não podem se ligar simultaneamente. Todas as combinações de pares de anticorpos foram testadas. Dados representativos de MF-T são mostrados (A). O painel B mostra as posições relativas de epítopos de sete anticorpos antimesotelina, onde a competição é mostrada por círculos sobrepostos.

[00026] A figura 2 mostra formas diferentes de mesotelina identificadas por anticorpos da invenção. 1. e 2.: ligação MF-J à mesotelina em extratos celulares OVCAR-3; 3. e 4.: ligação MF-J à mesotelina em extratos celulares CHO-A9; 5. ligação MF-J à mesotelina em extratos celulares NCI-H226; 6. ligação MF-J à mesotelina desglicosilada recombinante; 7. ligação MOR06635 a extratos celulares OVCAR-3; e ligação 8. MOR06635 a extratos celulares NCI-H226.

[00027] A figura 3 mostra que o antígeno de câncer 125 (CA125) se liga à mesotelina quando esse é ligado a um subconjunto de anticorpos de mesotelina inclusive MOR06640 e MF-T, enquanto outros anticorpos, como MF-226, competem com CA125 para ligação à mesotelina. Os dados mostrados são unidades relativas de luz (RLU) detectadas por SECTOR Light Imager (Meso Scale Discovery). As placas foram cobertas com o anticorpo contra mesotelina mostrado. A mesotelina foi adicionada nas concentrações indicadas e titulada. CA125 foi ligado subsequentemente em uma concentração constante. A detecção foi realizada com um anticorpo anti-CA125 de camundongo e anticorpo FAB anticamundongo marcado por marcador MSD Sulfo.

[00028] A figura 4 fornece dados sobre a internalização de anticorpos 1251-antimesotelina em células CHO-A9 que expressam mesotelina. A

internalização relativa de sete mabs antimesotelina, inclusive o controle positivo comercial K1, na ausência (A), e na presença (B) do segundo anticorpo estabilizante. Dados representativos que utilizam MF-226 mais o segundo anticorpo, mostrando quantidades relativas de anticorpo dissociado, ligado à superfície e internalizado a 37°C ao longo do tempo (C) são comparados com aqueles na temperatura não-permissiva de 0°C (D).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00029] A presente invenção está baseada na descoberta de novos anticorpos que são específicos ou possuem uma alta afinidade para mesotelina e podem proporcionar um benefício terapêutico a um indivíduo. Os anticorpos da invenção, que podem ser humanos ou humanizados, podem ser usados em muitos contextos, que estão mais completamente descritos aqui.

Definições

[00030] Um anticorpo "humano" ou fragmento de anticorpo humano funcional é definido por meio deste como não quimérico (por exemplo, não-"humanizado") e não de (tanto no total como em parte) uma espécie não-humana. Um anticorpo humano ou fragmento de anticorpo funcional pode ser derivado de um humano ou pode ser um anticorpo humano sintético. Um "anticorpo humano sintético" é definido aqui como um anticorpo que possui uma sequência derivada, no total ou em parte, *in silico* de sequências sintéticas que são baseadas na análise de sequências de anticorpo humano conhecidas. O desenho *in silico* de uma sequência de anticorpo humano ou fragmento da mesma pode ser realizado, por exemplo, ao analisar um banco de dados de um anticorpo humano ou sequências de fragmento de anticorpo e desenvolver uma sequência polipeptídica utilizando os dados obtidos. Outro exemplo de um anticorpo humano ou fragmento de anticorpo funcional é um que é codificado por um ácido nucleico isolado de uma biblioteca de

sequências de anticorpo de origem humana (ou seja, tal biblioteca está baseada em anticorpos retirados de uma fonte natural humana). Exemplos de anticorpos humanos incluem anticorpos HuCAL, como descrito em Knappik et al., J. Mol. Biol. (2000) 296:57 e Patente U.S. No.6.300.064.

[00031] Um "anticorpo humanizado" ou fragmento de anticorpo humanizado funcional é definido aqui como um que é (i) derivado de uma fonte não-humana (por exemplo, um camundongo transgênico que é dotado de um sistema imune heterólogo), tal anticorpo se baseia em uma sequência de linha germinativa humana; ou (ii) quimérico, onde o domínio variável é derivado de uma origem não-humana e o domínio constante é derivado de uma origem humana ou (iii) enxertado por CDR, onde as CDRs do domínio variável são de uma origem não-humana, enquanto uma ou mais estruturas do domínio variável são de origem humana e o domínio constante (se houver algum) é de origem humana.

[00032] Como usado aqui, um anticorpo "se liga especificamente a", é "específico a/para" ou "identifica especificamente" um antígeno (aqui, mesotelina) se tal anticorpo for capaz de distinguir entre tal antígeno e um ou mais antígeno(s) de referência, visto que a especificidade de ligação não é uma propriedade absoluta, porém relativa. Em sua forma mais geral (e quando nenhuma referência definida for mencionada), "ligação específica" refere-se à capacidade de o anticorpo distinguir entre o antígeno de interesse e um antígeno não-relacionado, como determinado, por exemplo, de acordo com um dos seguintes métodos. Tais métodos compreendem, porém sem caráter limitativo, ensaios Western blots, testes ELISA, RIA, ECL, IRMA e ensaios peptídicos. Por exemplo, um teste ELISA padrão pode ser realizado. A marcação pode ser realizada por desenvolvimento de cor padrão (por exemplo, anticorpo secundário com peróxido de rábano silvestre e tetrametil benzidina com peróxido de hidrogênio). A reação em determinados

poços é marcada pela densidade óptica, por exemplo, a 450 nm. A base típica (=reação negativa) pode ser 0,1 OD; reação positiva típica pode ser 1 OD. Isso significa que a diferença positiva/negativa pode ser maior que 10 vezes. Tipicamente, a determinação de especificidade de ligação é realizada não utilizando um único antígeno de referência, porém um conjunto de cerca de três a cinco antígenos não-relacionados, como pó de leite, BSA, transferrina ou similares.

[00033] Entretanto, "ligação específica" também pode se referir à capacidade de um anticorpo distinguir entre o antígeno-alvo e um ou mais antígenos estreitamente relacionados, que são usados como pontos de referência. Adicionalmente, "ligação específica" pode se referir à capacidade de um anticorpo distinguir entre partes diferentes de seu antígeno alvo, por exemplo, domínios ou regiões diferentes de mesotelina, como epitopos na região N-terminal ou C-terminal de mesotelina, ou entre um ou mais resíduos de aminoácido principais de resíduos de aminoácido de mesotelina.

[00034] Também, como usado aqui, uma "imunoglobulina" (Ig) é definida aqui como uma proteína que pertence à classe IgG, IgM, IgE, IgA, ou IgD (ou qualquer subclasse da mesma), e inclui todos os anticorpos convencionalmente conhecidos e fragmentos funcionais dos mesmos. Um "fragmento funcional" ou "fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno" de um anticorpo/imunoglobulina é definido aqui como um fragmento de um anticorpo/imunoglobulina (por exemplo, uma região variável de um IgG) que retém a região de ligação ao antígeno. Uma "região de ligação ao antígeno" de um anticorpo tipicamente é encontrada em uma ou mais regiões hipervariáveis de um anticorpo, ou seja, as regiões CDR-I, -2, e/ou -3; entretanto, as regiões de "estrutura" variável também podem exercer uma função importante na ligação ao antígeno, como fornecendo um arcabouço das CDRs. De preferência, a "região de ligação ao antígeno" compreende pelo menos os resíduos de

aminoácido 4 a 103 da cadeia leve variável (VL) e 5 a 109 da cadeia pesada variável (VH), com mais preferência, os resíduos de aminoácido 3 a 107 de VL e 4 a 111 de VH, e as cadeias VL e VH completas (posições de aminoácido 1 a 109 de VL e 1 a 113 de VH; numeração de acordo com WO 97/08320) são particularmente preferidas. Uma classe preferida de imunoglobulinas para uso na presente invenção é IgG. Os "fragmentos funcionais" da invenção incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; anticorpos bivalentes; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia simples (scFv); e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo (C. A. K Borrebaeck, editor (1995) *Anticorpo Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology)*, Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors (2001) *Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual)*, Springer Verlag). Entende-se que cada anticorpo em vez de um anticorpo "biespecífico" ou "bifuncional" possui um de seus sítios de ligação idêntico. O F(ab')₂ ou Fab pode ser elaborado para minimizar ou remover completamente as interações de dissulfeto intermoleculares que ocorrem entre os domínios C_{H1} e C_L.

[00035] Um anticorpo da invenção pode ser derivado de uma biblioteca de anticorpo recombinante que se baseia em sequências de aminoácido que foram projetadas *in silico* e codificadas por ácidos nucleicos que são sinteticamente criados. O desenho *in silico* de uma sequência de anticorpo é realizado, por exemplo, ao analisar um banco de dados de sequências humanas e desenvolver uma sequência polipeptídica utilizando os dados obtidos. Os métodos de desenho e obtenção de sequências criadas *in silico* são descritos, por exemplo, em Knappik et al., J. Mol. Biol. (2000) 296:57; Krebs et al., J. Immunol. Methods. (2001) 254:67; e Patente U.S. No. 6.300.064 emitida a Knappik et al, que estão aqui incorporados a título de referência em sua totalidade. Como usado aqui, "formas" diferentes de antígeno, por

exemplo, mesotelina, são definidas aqui como moléculas de proteína diferentes resultantes de modificações traducionais e pós-traducionais diferentes, como, porém sem caráter limitativo, diferenças em junção da transcrição de mesotelina primária, diferenças em glicosilação, e diferenças em clivagem proteolítica pós-traducional.

[00036] Como usado aqui, o termo "ligação invariável" de um anticorpo particular à mesotelina refere-se a sua capacidade de se ligar à mesotelina em uma ampla gama de linhagens celulares de expressão de mesotelina que expressam formas diferentes de mesotelina. Para ligação invariável de anticorpos, os valores EC50 determinados por titulação de FACS em duas linhagens celulares de câncer diferentes devem se diferir em não mais de 10 vezes, ou, de preferência, 5 vezes, e com mais preferência, entre 1 e 3 vezes.

[00037] Como usado aqui, o termo "epitopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor de célula T. Os determinantes epitópicos consistem geralmente em agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e possuem geralmente características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Diz-se que dois anticorpos "se ligam ao mesmo epitopo" se um anticorpo for mostrado para competir com o segundo anticorpo em um ensaio por ligação competitiva, por qualquer um dos métodos bem conhecidos pelos versados na técnica.

Anticorpos da Invenção

[00038] A presente invenção refere-se a métodos para inibir o crescimento de células cancerígenas mesotelina-positivas e a progressão de doença neoplásica fornecendo anticorpos antimesotelina. Os anticorpos monoclonais humanos, fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno dos mesmos, e variantes dos

anticorpos e fragmentos que são proporcionados se ligam especificamente ao domínio C-terminal de 40 kDa do polipeptídeo precursor de mesotelina (SEQ ID NO 370), que é denominado "mesotelina" aqui.

[00039] Os anticorpos, fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno, e variantes dos anticorpos e fragmentos da invenção são compreendidos de uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada. As variantes dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno contempladas na invenção são moléculas onde a atividade de ligação do anticorpo ou fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno de mesotelina é mantida.

[00040] Ao longo do mesmo documento, faz-se referência aos seguintes anticorpos representativos da invenção: "MF-J", "MOR07265", "MOR06631", "MOR 06635", "MOR06669", "MOR07111", "MOR06640", "MOR06642", "MOR06643", "MF-226", "MOR06626", "MOR06638", "MF-A", "MOR06657", "MF-T", "MF1", "MF-5", "MF-8", "MF-24", "MF-25", "MF-27", "MF-73", "MF-78", "MF-84", "MF-101", "MF-230", "MF-236", "MF-252", "MF-257", "MF-423", "MF-427", "MF-428", "MF-C", "MF-I", "MF-L", "MF-M", "MF-P", "MF-Q", "MF-S", "MF-V", "MF-W", e "MF-Y". MF-J representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 284 (DNA)/SEQ ID NO: 198 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 327 (DNA)/SEQ ID NO: 241 (proteína). MOR 07265 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 285 (DNA)/SEQ ID NO: 199 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 328 (DNA)/SEQ ID NO: 242 (proteína). MOR 06631 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 286 (DNA)/SEQ ID NO: 200 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 329 (DNA)/SEQ ID NO: 243 (proteína). MOR 06669 representa um

anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 287 (DNA)/SEQ ID NO: 201 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 330 (DNA)/SEQ ID NO: 244 (proteína). MOR 07111 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 288 (DNA)/SEQ ID NO: 202 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 331 (DNA)/SEQ ID NO: 245 (proteína). MOR 06640 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 289 (DNA)/SEQ ID NO: 203 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 332 (DNA)/SEQ ID NO: 246 (proteína). MOR 06642 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 290 (DNA)/SEQ ID NO: 204 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 333 (DNA)/SEQ ID NO: 247 (proteína). MOR 06643 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 291 (DNA)/SEQ ID NO: 205 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 334 (DNA)/SEQ ID NO: 248 (proteína). MF-226 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 292 (DNA)/SEQ ID NO: 206 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 335 (DNA)/SEQ ID NO: 249 (proteína). MOR 06626 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 293 (DNA)/SEQ ID NO: 207 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 336 (DNA)/SEQ ID NO: 250 (proteína). MOR 06635 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 294 (DNA)/SEQ ID NO: 208 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 337 (DNA)/SEQ ID NO: 251 (proteína). MOR 06638 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 295 (DNA)/SEQ ID NO: 209 (proteína) e uma região leve

variável correspondente a SEQ ID NO: 338 (DNA)/SEQ ID NO: 252 (proteína). MF-A representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 296 (DNA)/SEQ ID NO: 210 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 339 (DNA)/SEQ ID NO: 253 (proteína). MOR 06657 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 297 (DNA)/SEQ ID NO: 211 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 340 (DNA)/SEQ ID NO: 254 (proteína). MF-T representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 298 (DNA)/SEQ ID NO: 212 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 341 (DNA)/SEQ ID NO: 255 (proteína). MF-L representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 299 (DNA)/SEQ ID NO: 213 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 342 (DNA)/SEQ ID NO: 256 (proteína). MF-I representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 300 (DNA)/SEQ ID NO: 214 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 343 (DNA)/SEQ ID NO: 257 (proteína). MF-5 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 301 (DNA)/SEQ ID NO: 215 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 344 (DNA)/SEQ ID NO: 258 (proteína). MF-8 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 302 (DNA)/SEQ ID NO: 216 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 345 (DNA)/SEQ ID NO: 259 (proteína). MF-24 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 303 (DNA)/SEQ ID NO: 217 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 346 (DNA)/SEQ ID NO: 260 (proteína). MF-25 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO:

304 (DNA)/SEQ ID NO: 218 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 347 (DNA)/SEQ ID NO: 261 (proteína). MF-27 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 305 (DNA)/SEQ ID NO: 219 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 348 (DNA)/SEQ ID NO: 262 (proteína). MF-73 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 306 (DNA)/SEQ ID NO: 220 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 349 (DNA)/SEQ ID NO: 263 (proteína). MF-78 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 307 (DNA)/SEQ ID NO: 221 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 350 (DNA)/SEQ ID NO: 264 (proteína). MF-84 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 308 (DNA)/SEQ ID NO: 222 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 351 (DNA)/SEQ ID NO: 265 (proteína). MF-101 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 309 (DNA)/SEQ ID NO: 223 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 352 (DNA)/SEQ ID NO: 266 (proteína). MF-230 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 310 (DNA)/SEQ ID NO: 224 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 353 (DNA)/SEQ ID NO: 267 (proteína). MF-236 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 311 (DNA)/SEQ ID NO: 225 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ DD NO: 354 (DNA)/SEQ ID NO: 268 (proteína). MF-252 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 312 (DNA)/SEQ ID NO: 226 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 355 (DNA)/SEQ ID NO: 269 (proteína). MF-275 representa um anticorpo que possui uma região

pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 313 (DNA)/SEQ ID NO: 227 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ DD NO: 356 (DNA)/SEQ ID NO: 270 (proteína). MF-423 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ DD NO: 314 (DNA)/SEQ ID NO: 228 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 357 (DNA)/SEQ ID NO: 271 (proteína). MF-427 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 315 (DNA)/SEQ ID NO: 229 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ DD NO: 358 (DNA)/SEQ ID NO: 272 (proteína). MF-428 representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 316 (DNA)/SEQ ID NO: 230 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 359 (DNA)/SEQ ID NO: 273 (proteína). MF-C representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 317 (DNA)/SEQ ID NO: 231 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 360 (DNA)/SEQ ID NO: 274 (proteína). MF-I representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 318 (DNA)/SEQ ID NO: 232 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 361 (DNA)/SEQ ID NO: 275 (proteína). MF-M representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 319 (DNA)/SEQ ID NO: 233 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 362 (DNA)/SEQ ID NO: 276 (proteína). MF-P representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 320 (DNA)/SEQ ID NO: 234 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 363 (DNA)/SEQ ID NO: 277 (proteína). MF-Q representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 321 (DNA)/SEQ ID NO: 235 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 364 (DNA)/SEQ ID NO: 278

(proteína). MF-S representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 322 (DNA)/SEQ ID NO: 236 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 365 (DNA)/SEQ ID NO: 279 (proteína). MF-U representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 323 (DNA)/SEQ ID NO:

237 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 366 (DNA)/SEQ ID NO: 280 (proteína). MF-V representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 324 (DNA)/SEQ ID NO: 238 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 367 (DNA)/SEQ ID NO: 281 (proteína). MF-W representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 325 (DNA)/SEQ ID NO: 239 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 368 (DNA)/SEQ ID NO: 282 (proteína). MF-Y representa um anticorpo que possui uma região pesada variável correspondente a SEQ ID NO: 326 (DNA)/SEQ ID NO: 240 (proteína) e uma região leve variável correspondente a SEQ ID NO: 369 (DNA)/SEQ ID NO: 283 (proteína).

[00041] Em um aspecto, a invenção fornece anticorpos que se ligam a epitopos de mesotelina, cuja sequência de aminoácido é mostrada pela SEQ ID NO: 370, que são diferentes do epitopo de mesotelina identificado por Mab K1.

[00042] Em outros aspectos, a invenção fornece anticorpos que se ligam a um ou mais aminoácidos dos epitopos de anticorpos MF-J ou MF-T. Em determinados aspectos, os ditos anticorpos se ligam a pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco ou pelo menos seis aminoácidos dos epitopos de anticorpos MF-J ou MF-T. Em alguns aspectos, os anticorpos da presente invenção se ligam a um ou mais aminoácidos do epitopo identificado pelo anticorpo MF-J. Em aspectos alternativos os anticorpos da presente invenção se ligam

a um ou mais aminoácidos do epítipo identificado pelo anticorpo MF-T.

[00043] Em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos que possuem uma região de ligação ao antígeno que podem se ligar especificamente ou possuir uma alta afinidade com uma ou mais regiões de mesotelina, cuja sequência de aminoácido é mostrada pela SEQ ID NO: 370. Diz-se que um anticorpo possui uma "alta afinidade" com um antígeno se a medida de afinidade for pelo menos 100 nM (afinidade monovalente de fragmento Fab). Um anticorpo ou uma região de ligação ao antígeno inventivo, de preferência, pode ligar-se à mesotelina com uma afinidade de menos de 100 nM, com mais preferência, menos de cerca de 60 nM, e com ainda mais preferência, menos de cerca de 30 nM. Os anticorpos que se ligam à mesotelina com uma afinidade de menos de cerca de 10 nM, e com mais preferência, de menos de cerca de 3 nM são adicionalmente preferidos. Por exemplo, a afinidade de um anticorpo da invenção contra mesotelina pode ser cerca de 10,0 nM ou 0,19 nM (afinidade monovalente de fragmento Fab).

[00044] A Tabela 1 fornece um sum de constantes de dissociação e taxas de dissociação de anticorpos representativos da invenção, como determinado por ressonância plasmônica de superfície (Biacore) em mesotelina diretamente imobilizada.

Tabela 1: Constantes de dissociação e taxas de dissociação monovalentes de mesotelina determinadas para Fabs antimesotelina por ressonância plasmônica de superfície

Anticorpo	K_D [M]	K_d [1/s]
MF-A	$1,9 \times 10^{-9}$	$7,9 \times 10^{-2}$
MOR06657	$9,5 \times 10^{-10}$	$5,5 \times 10^{-3}$
MF-J	$9,2 \times 10^{-9}$	$2,9 \times 10^{-3}$
MOR06631	9×10^{-11}	$1,4 \times 10^{-5}$
MOR06669	$2,4 \times 10^{-10}$	$8,1 \times 10^{-5}$
MOR06643	$3,6 \times 10^{-10}$	$2,8 \times 10^{-4}$

MF-226	$5,8 \times 10^{-8}$	$3,8 \times 10^{-2}$
MOR06626	$6,7 \times 10^{-10}$	$1,2 \times 10^{-3}$
MOR06638	$1,6 \times 10^{-8}$	$6,3 \times 10^{-3}$

[00045] O formato IgG1 foi usado para a determinação de afinidade baseada em células, determinado por separação de células ativadas por fluorescência (FACS) combinada com análise de Scatchard, e ensaio de imunossorvente ligado à enzima de células vivas (ELISA). A Tabela 2 denota a força de ligação de anticorpos IgG representativos em células CHO-A9 de expressão de mesotelina.

Tabela 2: Potência de ligação baseada em célula de anticorpos antimesotelina como determinado por ELISA celular e FACS em células CHO-A9 de expressão de mesotelina

Anticorpo (IgG)	EC50	
	FACS [nm]	ELISA Celular [nM]
MF-A	0,05	0,8
MF-J	0,11	3,9
MF-L	0,07	0,8
MF-T	0,27	1,5
MF-226	0,15	0,4

Geração de Anticorpos

[00046] Uma biblioteca apresentada em fagos de anticorpo sintético (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. (2000) 296(1): 57) foi usada para isolar anticorpos monoclonais humanos específicos para mesotelina de alta afinidade por uma combinação de todas as separações de célula e proteína e através do desenvolvimento de ferramentas específicas. Essas ferramentas e métodos incluem uma linhagem celular recombinante de expressão de mesotelina e o desenvolvimento de procedimentos de separação e ensaios de classificação capazes de identificar anticorpos que se ligam, de preferência, à mesotelina apresentada na superfície celular e que são de reatividade cruzada com

mesotelina de outra espécie.

[00047] Os anticorpos contra o marcador de superfície celular de câncer mesotelial, mesotelina, foram descobertos por uma combinação de três abordagens não-convencionais em tecnologia de apresentação em fagos (PDT). Primeiro, uma linhagem celular recombinante que expressa o domínio de 40 kDa ligado à membrana de mesotelina foi construída por transfecção estável de células CHO-K1 com um plasmídeo que codifica a parte C-terminal fixado a GPI da proteína (SEQ ID 371), para obter a linhagem celular CHO-A9. Segundo, as seleções de superfície celular de alternância dupla foram realizadas com a última linhagem celular recombinante e a linhagem celular de câncer escamoso NCI-H226. A pré-adsorção com células CHO-K1 foi incluída para evitar a seleção de fragmentos Fab que se ligam a epitopos das células parentais. Seleções adicionais foram realizadas com mesotelina humana purificada solúvel recombinante (única fonte de "MF-24", "MF-25", e "MF-27"), com mesotelina murina recombinante com mesotelina desglicosilada purificada (única fonte de "MF-5" e "MF-8"), e com mesotelina biotinizada em fase solúvel. Terceira, os métodos de classificação que foram desenvolvidos permitem a classificação sucessiva das produções de fagos obtidas em separação em todas as células NCI-H226 bem como células CHO-A9. A combinação dos mesmos métodos específicos permitiu o isolamento dos anticorpos exclusivos "MF-J", "MF-226", "MF-A", "MF-T", "MF-I", "MF-5", "MF-8", "MF-24", "MF-25", "MF-27", "MF-73", "MF-78", "MF-84", "MF-101", "MF-230", "MF-236", "MF-252", "MF-275", "MF-423", "MF-427", "MF-428", "MF-C", "MF-I", "MF-L", "MF-M", "MF-P", "MF-Q", "MF-S", "MF-U", "MF-V", "MF-W" e "MF-Y". Esses anticorpos exclusivos foram adicionalmente caracterizados por sua afinidade de ligação em dois ensaios ELISA baseados em célula, junto a BIAcore à mesotelina solúvel, por sua capacidade de identificar epitopos diferentes em

mesotelina solúvel, e por sua capacidade de reação cruzada com mesotelina murina avaliada por FACS e estudo imunológico, e sua capacidade de ser internalizado em três ensaios baseados em células diferentes. Dois dos ensaios de internalização mediram de maneira quantitativa a internalização de anticorpos antimesotelina radiomarcados tanto na ausência como na presença de um anticorpo secundário ao IgG humano. Esse dado foi usado para selecionar quatro anticorpos para maturação de afinidade adicional.

[00048] Para obter anticorpos com ligação invariável robusta a diferentes formas de mesotelina apresentadas em linhagens celulares de câncer diferentes, para aumentar a reatividade cruzada de espécie, e ainda para aumentar a afinidade e reduzir as taxas de dissociação, uma estratégia para maturação de afinidade foi planejada. A maturação de afinidade foi realizada em anticorpos "MF-J", "MF-226", "MF-L" e "MF-A". A maturação de afinidade inclui a geração de novos repertórios de anticorpo pela troca de H-CDR2, L-CDR3, ou uma combinação tanto de regiões H-CDR2 como L-CDR3 dos anticorpos parentais. As seleções alternadas foram realizadas com as duas linhagens celulares de câncer de expressão de mesotelina NCI-H226 e OVCAR-3, bem como mesotelina humana e murina purificada e biotinilada recombinante em solução utilizando microesferas magnéticas. A estringência aumentada foi obtida por redução gradual de antígeno e extensão do procedimento de lavagem.

[00049] A classificação foi realizada primeiramente ao avaliar os acertos de afinidade reduzida, como determinado em microesferas cobertas com antígeno em solução, ao medir um sinal eletroquimiluminescente em uma Estação de Trabalho M-384 (BioVeris). Subsequentemente, uma seleção resultante de aglutinantes de alta afinidade foi submetida à classificação de titulação de equilíbrio de solução (SET) (Haenel, C, et al, Anal. Biochem. (2005) 339(1): 182).

Os melhores aglutinantes foram adicionalmente classificados por análise de reatividade cruzada com mesotelina murina, bem como para ligação à mesotelina em células NCI-H226 por FACS. A combinação dos mesmos métodos específicos permitiu o isolamento dos anticorpos exclusivos "MOR07265", "MOR06631", "MOR 06635", "MOR06669", "MOR07111", "MOR06640", "MOR06642", "MOR06643", "MOR06626", "MOR06638" e "MOR06657".

Variantes Peptídicas

[00050] Os anticorpos da invenção não são limitados às sequências peptídicas específicas fornecidas aqui. De preferência, a invenção também inclui variantes dos mesmos polipeptídeos. Com referência à presente descrição e tecnologias e referências convencionalmente disponíveis, o versado na técnica será capaz de preparar, testar e utilizar variantes funcionais dos anticorpos mostrados aqui, enquanto avaliam que as variantes que possuem a capacidade de se ligar à mesotelina estão dentro do escopo da presente invenção.

[00051] Uma variante pode incluir, por exemplo, um anticorpo que possui pelo menos uma região determinante de complementaridade alterada (CDR) (hipervariável) e/ou domínio/posição de estrutura (FR) (variável), em relação a uma sequência peptídica mostrada aqui. Para ilustrar melhor esse conceito, segue uma breve descrição de estrutura de anticorpo. Um anticorpo é composto de duas cadeias peptídicas, cada uma contendo um (cadeia leve) ou três (cadeia pesada) domínios constantes e uma região variável (VL, VH), sendo que a última é em cada caso constituída de quatro regiões FR e três CDRs espaçadas. O sítio de ligação ao antígeno é formado por uma ou mais CDRs, as regiões FR fornecem ainda o arcabouço estrutural das CDRs e, conseqüentemente, exercem uma função importante na ligação ao antígeno. Alterando-se um ou mais resíduos de aminoácido em uma CDR ou região FR, o versado na técnica pode gerar usualmente

seqüências de anticorpo modificadas ou diversificadas, que podem ser analisadas contra o antígeno, quanto a propriedades novas ou aprimoradas, por exemplo.

[00052] As Tabelas 3 (VH) e 4 (VL) descrevem as regiões CDR e FR de determinados anticorpos da invenção e comparam aminoácidos em uma determinada posição uns com os outros e com as seqüências consenso ou de "gene principal" correspondentes (como descrito na Patente U.S. No. 6.300.064):

Tabela 3: Sequências VH

			CDR1		CDR2	
			1	50	51	100
MF-226 HC	(1)		A V V A T G N Y N	Q	I	
MF-A HC	(1)		Q S V V A G T S S Y F S	Q	G	
MF-T HC	(1)		S		I	
MF-J HC	(1)		N	M	V	
MOR06640 HC	(1)		Q N	M	V	
Consenso	(1)		QVELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	YWIGWVRQAPGKGLEWMGI		

			CDR2		CDR3	
			51	100	101	121
MF-226 HC	(51)		N H G D K A Q K R M T R T M E L R S E V W H			
MF-A HC	(51)		I K F G S A N A Q K R T T E T Y M E L A R S E V R T			
MF-T HC	(51)		D G R			
MF-J HC	(51)		M S Y			
MOR06640 HC	(51)		M S Y			
Consenso	(51)		IMP DS TRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYCYARYG			

			CDR3	
			101	121
MF-226 HC	(101)		TW--IF Y	
MF-A HC	(101)		S-----M Y	
MF-T HC	(100)		QLYGTYM G	
MF-J HC	(101)		MY GAL V	
MOR06640 HC	(101)		MY GAL V	
Consenso	(101)		HG YG LD WGQGT LVT VSS	

Tabela 4: Sequências VL

		CDR1		CDR2	
		1	50	51	100
MF-226 VL	(1)	██████-P████A████V████S████NI-SY████L███T████		██████NDNQ██████D██████S████A███T████S██████ST██DRRTFS	
MF-A VL	(1)	██████A████-██████████SI██████T███DVGY███H███K████M		██████SV██████SN██████NT██████A██████GAWAHMSLG	
MF-T VL	(1)	██████A████-██████████SI██████T███DI███GY███H███K████M		██████VNN██████SN██████NT██████A██████SS██DIESAT	
MF-J VL	(1)	██████S███TL███L███E███A███L███RA███Q███VRS--SRLA███K███Q███R███		██████A███AT███A███G███DFT███S███EP███F███T███QQ██YDFPP-	
MOR06640 VL	(1)	██████S███TL███L███E███A███L███RA███Q███VRS--SRLA███K███Q███R███		██████A███AT███A███G███DFT███S███EP███F███V███QQ██SHDPSG	
consenso	(1)	DIVLTQ PASVSGSPGQRITISCTGSSS IG N VSWYQQ PG APKLL		IYG SKRPSGVP RFSGSKSGTTASLTISGLQAEDEADYYC Y S	

		CDR3	
		101	114
MF-226 VL	(99)	██████████	██████████
MF-A VL	(100)	K██████████	██████████
MF-T VL	(100)	P██████████	██████████
MF-J VL	(98)	-T███Q███VEIKRT	
MOR06640 VL	(99)	-T███Q███VEIKRT	
consenso	(101)	VFGGGTKLTVLGQ	

[00053] Em alguns aspectos, a presente invenção fornece anticorpos

- em que a região HCDR1 é selecionada a partir de ID's de sequência [todas as respectivas IDs de SEQ de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30.

- em que a região HCDR2 é selecionada a partir de ID's de sequência 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 ou 66.

- em que a região HCDR3 é selecionada a partir de ID's de sequência 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 ou 98.

- em que a região LCDR1 é selecionada a partir de ID's de

sequência 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 102 ou 128.

- em que a região LCDR2 é selecionada a partir de ID's de sequência 129, 130, 131 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 ou 155.

- em que a região LCDR3 é selecionada a partir de ID's de sequência 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196 ou 197, ou combinações dessas regiões CDR.

[00054] Os aspectos preferidos são anticorpos: em que as sequências de CDR são selecionadas a partir da série MF-J, como mostrado na tabela 7 ou outras combinações das regiões CDR mostradas na tabela 7.

[00055] Em alguns aspectos, a presente invenção fornece anticorpos

- em que a VH é selecionada a partir da ID de sequência 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 ou 240,

- em que a VL é selecionada a partir de ID de sequência 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282 ou 283.

[00056] Como mostrado acima, os aspectos preferidos de série MF-J, como mostrado na tabela 7 ou outras combinações das regiões VH e VL mostradas na tabela 7.

[00057] O versado na técnica pode utilizar os dados nas Tabelas 3, 4 e 7 para projetar as variantes peptídicas que estão dentro do escopo

da presente invenção. Prefere-se que as variantes sejam construídas alterando os aminoácidos dentro de uma ou mais regiões CDR; uma variante também deve possuir uma ou mais regiões de estrutura alterada. Com referência a uma comparação dos novos anticorpos uns com os outros, os resíduos candidatos que podem ser alterados incluem, por exemplo, resíduos 3 ou 45 das cadeias leves variáveis e, por exemplo, resíduos 16 ou 43 das cadeias pesadas variáveis de MF-226 e MF-T, visto que essas são posições de variância umas em relação às outras. Alterações também podem ser feitas nas regiões de estrutura. Por exemplo, um domínio de peptídeo FR deve ser alterado quando houver um desvio em um resíduo comparado com uma sequência de linha germinativa.

[00058] Com referência a uma comparação dos novos anticorpos com a sequência consenso ou "gene principal" correspondente, que estão listados em Knappik et al., 2000, os resíduos candidatos que podem ser alterados incluem, por exemplo, resíduos 29 ou 52 da cadeia leve variável de MF-T comparado com VL λ 2 e, por exemplo, resíduos 43 ou 57 da cadeia pesada variável de MF-A comparado com VH1A (Knappik, A., *et al.*, J. Mol. Biol. (2000) 296(1): 57). Alternativamente, o versado na técnica poderia realizar a mesma análise comparando as sequências de aminoácido descritas aqui com sequências conhecidas da mesma classe de tais anticorpos, utilizando, por exemplo, o procedimento descrito por Knappik, A., *et al.* (2000) e Patente U.S. No. 6.300.064 concedida junto a Knappik et al.

[00059] Ademais, as variantes podem ser obtidas utilizando um anticorpo como ponto de partida para otimização ao diversificar um ou mais resíduos de aminoácido no anticorpo, de preferência, resíduos de aminoácido em uma ou mais CDRs, e ao classificar a coleção resultante de variantes de anticorpo para variantes com propriedades aprimoradas. A diversificação de um ou mais resíduos de aminoácido

em CDR-3 de VL, CDR-3 de VH, CDR-1 de VL e/ou CDR-2 de VH é particularmente preferida. A diversificação pode ser feita ao sintetizar uma coleção de moléculas de DNA utilizando tecnologia de metagênese de trinucleotídeo (TRIM) (Virnekäs, B., Ge, L., Pluckthun, A., Schneider, K.C., Wellnhofer, G., e Moroney S.E. (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucl. Acids Res. 22, 5600.).

Variantes de Aminoácidos Conservadores

[00060] As variantes polipeptídicas podem ser produzidas de modo a conservar a estrutura molecular geral de uma sequência peptídica de anticorpo descrita aqui. Determinadas as propriedades dos aminoácidos individuais, algumas substituições racionais serão identificadas pelo versado na técnica. As substituições de aminoácido, ou seja, "substituições conservadoras", podem ser realizadas, por exemplo, com base na similaridade em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, e/ou a natureza anfipática dos resíduos envolvidos.

[00061] Por exemplo, (a) os aminoácidos não-polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano, e metionina; (b) os aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, e glutamina; (c) os aminoácidos positivamente carregados (básicos) incluem arginina, lisina, e histidina; e (d) os aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. As substituições tipicamente podem ser realizadas dentro dos grupos (a)-(d). Ademais, glicina e prolina podem ser substituídas por uma outra com base em sua capacidade de desorganizar α -hélices. Similarmente, determinados aminoácidos, como alanina, cisteína, leucina, metionina, ácido glutâmico, glutamina, histidina e lisina são mais comumente encontrados em α -hélices, enquanto valina, isoleucina, fenilalanina,

tirosina, triptofano e treonina são mais comumente encontrados em folhas beta-pregueadas. Glicina, serina, ácido aspártico, asparagina, e prolina são comumente encontrados em série. Algumas substituições preferidas podem ser realizadas entre os seguintes grupos: (i) S e T; (ii) P e G; e (iii) A, V, L e I. Determinado o código genético conhecido, e técnicas de DNA recombinante e sintético, o cientista qualificado pode construir facilmente DNAs que codificam as variantes de aminoácidos conservadores. Em um exemplo particular, a posição de aminoácido 3 na SEQ ID NOS: 199 a 205, 207 a 211 ou 213 a 240 pode ser alterada de um Q para um E.

[00062] Como usado aqui, "identidade de sequência" entre duas sequências de polipeptídeo, indica a porcentagem de aminoácidos que são idênticos entre as sequências. A "homologia de sequência" indica a porcentagem de aminoácidos que são idênticos ou que representam substituições de aminoácidos conservadoras. As sequências de polipeptídeo preferidas da invenção possuem uma identidade de sequência nas regiões CDR de pelo menos 60%, com mais preferência, pelo menos 70% ou 80%, com ainda mais preferência, pelo menos 90% e, com máxima preferência, pelo menos 95%. Os anticorpos preferidos também possuem uma homologia de sequência nas regiões CDR de pelo menos 80%, com mais preferência, 90% e, com máxima preferência, 95%.

Moléculas de DNA da invenção

[00063] A presente invenção também se refere às moléculas de DNA que codificam um anticorpo da invenção. Essas sequências incluem, porém sem caráter limitativo, aquelas moléculas de DNA apresentadas na SEQ IDs 284-369.

[00064] As moléculas de DNA da invenção não são limitadas às sequências descritas aqui, porém também incluem variantes dessas. As variantes de DNA dentro da invenção podem ser descritas a título de

referência a suas propriedades físicas em hibridização. O versado na técnica irá reconhecer que o DNA pode ser usado para identificar seu complemento e, visto que o DNA possui cadeia dupla, seu equivalente ou homólogo, utilizando técnicas de hibridização de ácido nucleico. Também será identificado que a hibridização pode ocorrer com menos de 100% de complementaridade. Entretanto, determinada a seleção adequada de condições, técnicas de hibridização podem ser usadas para diferenciação entre sequências de DNA com base em sua relação estrutural a uma sonda particular. Para orientação com relação a tais condições vide Sambrook et al., 1989 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA) e Ausubel et al., 1995 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons).

[00065] A similaridade estrutural entre duas sequências de polinucleotídeo pode ser expressa como uma função de "estringência" das condições sob as quais as duas sequências serão hibridizadas uma com a outra. Como usado aqui, o termo "estringência" refere-se ao ponto que as condições desfavorecem a hibridização. As condições severas desfavorecem fortemente a hibridização, e apenas as moléculas mais estruturalmente relacionadas serão hibridizadas umas com as outras sob tais condições. De modo oposto, as condições não-severas favorecem a hibridização de moléculas que exibem um grau menor de relação estrutural. A estringência de hibridização, portanto, está diretamente correlacionada com as relações estruturais de duas sequências de ácido nucleico. As seguintes relações são úteis na correlação de hibridização e relação (onde T_m , é a temperatura de fusão de um ácido nucleico duplex):

$$a. T_m = 69,3 + 0,41 (G+C)\%$$

b. A T_n , de um DNA dúplex cai 1°C com cada aumento de 1% no número de pares de base não-compatíveis.

$$c. (T_m)_{\mu 2} - (T_m)_{\mu 1} = 18,5 \log_{10} \mu 2 / \mu 1$$

em que $\mu 1$ e $\mu 2$ são as forças iônicas de duas soluções.

[00066] A estringência de hibridização é uma função de muitos fatores, inclusive concentração de DNA total, força iônica, temperatura, tamanho de sonda e a presença de agentes que rompem a ligação de hidrogênio. Os fatores que promovem a hibridização incluem altas concentrações de DNA, altas forças iônicas, baixas temperaturas, tamanhos de sonda maiores e a ausência de agentes que rompem a ligação de hidrogênio. A hibridização tipicamente é realizada em duas fases: a fase de "ligação" e a fase de "lavagem".

[00067] Primeiro, na fase de ligação, a sonda é ligada ao alvo sob condições que favorecem a hibridização. A estringência é geralmente controlada nesse estágio alterando-se a temperatura. Para alta estringência, a temperatura está geralmente entre 65°C e 70°C, a menos que sondas de oligonucleotídeo curtas (< 20 nt) sejam usadas. Uma solução de hibridização representativa compreende 6X SSC, 0,5% de SDS, 5X solução de Denhardt e 100 µg de DNA de veículo não-específico. Vide Ausubel *et al*, section 2.9, supplement 27 (1994). Naturalmente, muitas condições de tampão diferentes, ainda funcionalmente equivalentes são conhecidas. Quando o grau de relação for menor, uma temperatura inferior pode ser selecionada. As temperaturas de ligação de baixa estringência estão entre cerca de 25°C e 40°C. A estringência média está entre pelo menos cerca de 40°C a menos de cerca de 65°C. A alta estringência é pelo menos cerca de 65°C.

[00068] Segundo, a sonda em excesso é removida por lavagem. É nessa fase que as condições mais severas geralmente são aplicadas. Então, essa etapa de "lavagem" é mais importante na determinação de

relação através de hibridização. As soluções de lavagem tipicamente contêm concentrações de sal inferiores. Uma solução de estringência média exemplificativa contém 2X SSC e 0,1% de SDS. Uma solução de lavagem de alta estringência contém o equivalente (em força iônica) de menos de cerca de 0,2X de SSC, com uma solução de estringência preferida contendo cerca de 0,1X de SSC. As temperaturas associadas a várias estringências são iguais às aquelas discutidas acima para "ligação". A solução de lavagem também é tipicamente substituída inúmeras vezes durante a lavagem. Por exemplo, as condições de lavagem de alta estringência típicas compreendem lavar duas vezes durante 30 minutos a 55°C e três vezes durante 15 minutos a 60°C.

[00069] Consequentemente, a presente invenção inclui moléculas de ácido nucleico que são hibridizadas com as moléculas apresentadas na SEQ ID 284-369 sob condições de lavagem e ligação de alta estringência, onde tais moléculas de ácido nucleico codificam um anticorpo ou fragmento funcional do mesmo que possui propriedades, como descrito aqui. As moléculas preferidas (de uma perspectiva de mRNA) são aquelas que possuem pelo menos 75% ou 80% (de preferência, pelo menos 85%, com mais preferência, pelo menos 90% e, com mais preferência, pelo menos 95%) de homologia ou identidade de sequência com uma das moléculas de DNA descritas aqui. Em um exemplo particular de uma variante da invenção, a posição de ácido nucleico 7 na SEQ ID NOS: 285-291, 293-297, ou 299-326 pode ser substituída de C para G, do mesmo modo, alterando o códon de CAA para GAA.

Variantes Funcionalmente Equivalentes

[00070] Ainda outra classe de variantes de DNA dentro do escopo da invenção pode ser descrita com referência ao produto que essa codifica. Esses genes funcionalmente equivalentes são caracterizados pelo fato de que codificam as mesmas sequências peptídicas encontradas na

SEQ ID 284-369 devido à degeneração do código genético.

[00071] É reconhecido que as variantes de moléculas de DNA fornecidas aqui podem ser construídas de diversas maneiras diferentes. Por exemplo, essas podem ser construídas como DNAs completamente sintéticos. Métodos para sintetizar oligonucleotídeos de maneira eficaz na faixa de 20 a cerca de 150 nucleotídeos estão amplamente disponíveis. Veja Ausubel et al., section 2.11, Supplement 21 (1993). Os oligonucleotídeos sobrepostos podem ser sintetizados e arranjados de uma maneira, primeiramente, relatada por Khorana et al., J. Mol. Biol. 72:209-217 (1971); veja também Ausubel et al, supra, Section 8.2. Os DNAs sintéticos são, de preferência, desenhados com sítios de restrição convenientes elaborados nas extremidades 5' e 3' do gene para facilitar a clonagem em um vetor adequado.

[00072] Como indicado, um método de geração de variantes deve começar com um dos DNAs descritos aqui e então deve conduzir a metagênese sítio-dirigida. Veja Ausubel et al., supra, chapter 8, Supplement 37 (1997). Em um método típico, um DNA alvo é clonado em um veículo bacteriófago de DNA de cadeia simples. O DNA de cadeia simples é isolado e hibridizado com um oligonucleotídeo contendo a(s) alteração(ões) de nucleotídeo desejada(s). A fita complementar é sintetizada e o fago de fita dupla é introduzido em um hospedeiro. Algumas progênies resultantes irão conter o mutante desejado, isso pode ser confirmado utilizando sequenciamento de DNA. Ademais, vários métodos estão disponíveis para aumentar a probabilidade que o fago da progênie será o mutante desejado. Esses métodos são bem conhecidos pelos versados na técnica e kits estão comercialmente disponíveis para gerar tais mutantes.

Construtos e expressão de DNA recombinantes

[00073] A presente invenção proporciona ainda construtos de DNA recombinantes que compreendem uma ou mais sequências de

nucleotídeo da presente invenção. Os construtos recombinantes da presente invenção são usados em conjunto com um vetor, como um plasmídeo, fagomídeo, fago ou vetor viral, dentro do qual insere-se uma molécula de DNA que codifica um anticorpo da invenção.

[00074] O gene codificado pode ser produzido por técnicas descritas em Sambrook et al., 1989, e Ausubel et al, 1989. Alternativamente, as sequências de DNA podem ser quimicamente sintetizadas utilizando, por exemplo, sintetizadores. Veja, por exemplo, as técnicas descritas em OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (1984, Gait, ed., BRL Press, Oxford), que está aqui incorporado a título de referência em sua totalidade. Os construtos recombinantes da invenção são compreendidos com vetores de expressão que são capazes de expressar o RNA e/ou produtos proteicos do(s) DNA(s) codificado(s). O vetor pode compreender ainda sequências reguladoras, inclusive um promotor ligado de maneira funcional ao quadro de leitura aberta (ORF). O vetor pode compreender ainda uma sequência marcadora selecionável. A iniciação específica e sinais secretórios bacterianos também podem ser exigidos para tradução eficaz de sequências de codificação de gene alvo inseridas.

[00075] A presente invenção fornece ainda células hospedeiras contendo pelo menos um dos DNAs da presente invenção. A célula hospedeira pode ser virtualmente qualquer célula para a qual os vetores de expressão estão disponíveis. Essa pode ser, por exemplo, uma célula hospedeira eucariótica superior, como uma célula de mamífero, uma célula hospedeira eucariótica inferior, como uma célula de levedura, e pode ser uma célula procariótica, como uma célula bacteriana. A introdução do construto recombinante na célula hospedeira pode ser realizada por transfecção de fosfato de cálcio, DEAE, transfecção mediada por dextrano, eletroporação ou infecção por fagos.

Expressão Bacteriana

[00076] Os vetores de expressão úteis para uso bacteriano são construídos ao inserir uma sequência de DNA estrutural que codifica uma proteína desejada juntamente com iniciação de tradução adequada e sinais de terminação em fase de leitura operável com um promotor funcional. O vetor irá compreender um ou mais marcadores selecionáveis fenotípicos e uma origem de replicação para garantir a manutenção do vetor e, se desejável, proporcionar amplificação dentro do hospedeiro. Os hospedeiros procarióticos adequados para transformação incluem *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e várias espécies dentro dos gêneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Staphylococcus*.

[00077] Os vetores bacterianos podem ser, por exemplo, baseados em bacteriófago, plasmídeo ou fagomídeo. Esses vetores podem conter um marcador selecionável e origem bacteriana de replicação derivada de plasmídeos comercialmente disponíveis contendo tipicamente elementos do vetor de clonagem bem conhecido pBR322 (ATCC 37017). Após a transformação de uma cepa hospedeira adequada e crescimento da cepa hospedeira a uma densidade celular adequada, o promotor selecionado é desreprimido/induzido por meios adequados (por exemplo, mudança de temperatura ou indução química) e as células são cultivadas durante um período adicional. As células são tipicamente colhidas por centrifugação, divididas por meios físicos ou químicos, e o extrato cru resultante retido para purificação adicional.

[00078] Em sistemas bacterianos, inúmeros vetores de expressão podem ser vantajosamente selecionados dependendo do uso pretendido da proteína que será expressa. Por exemplo, quando uma grande quantidade de tal proteína for produzida, para a geração de anticorpos ou para classificar bibliotecas de peptídeos, por exemplo, vetores que conduzem a expressão de altos níveis de produtos de

proteína de fusão que são facilmente purificados podem ser desejados.

Métodos Terapêuticos

[00079] Os métodos terapêuticos envolvem administrar a um indivíduo necessitado de tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo contemplado pela invenção. Uma quantidade "terapeuticamente eficaz" é definida aqui como a quantidade de um anticorpo que possui uma quantidade suficiente para depleção de células mesotelina-positivas em uma área tratada de um indivíduo – como uma dose única ou de acordo com um regime de múltiplas doses, por si só ou em combinação com outros agentes, resultando no alívio da condição adversa, tal quantidade é ainda toxicologicamente tolerável. O indivíduo pode ser um animal humano ou não-humano (por exemplo, coelho, rato, camundongo, macaco ou outro primata de ordem inferior).

[00080] Um anticorpo da invenção deve ser coadministrado com medicamentos conhecidos, e em alguns casos o próprio anticorpo deve ser modificado. Por exemplo, um anticorpo poderia ser conjugado com uma imunotoxina ou radioisótopo para aumentar potencialmente a eficácia.

[00081] Os anticorpos inventivos podem ser usados como uma ferramenta terapêutica ou de diagnóstico em uma variedade de situações onde a mesotelina é indesejavelmente expressa ou encontrada. As doenças e condições particularmente adequadas para o tratamento com um anticorpo da invenção consiste em câncer pancreático, câncer ovariano, mesotelioma e câncer pulmonar.

[00082] Para tratar qualquer uma das doenças anteriores, composições farmacêuticas para uso de acordo com a presente invenção podem ser formuladas de maneira convencional utilizando um ou mais veículos ou excipientes fisiologicamente aceitável. Um anticorpo da invenção pode ser administrado por qualquer meio

adequado, que pode variar, dependendo do tipo de doença que será tratado. As vias de administração possíveis incluem administração parenteral (por exemplo, intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea), intrapulmonar e intranasal, e, se desejado para tratamento imunossupressor local, administração intralesional. Ademais, um anticorpo da invenção deve ser administrado por infusão por pulso, com, por exemplo, doses decrescentes do anticorpo. De preferência, a dosagem é administrada por injeções, com mais preferência, injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte se a administração é breve ou crônica. A quantidade que será administrada irá depender de uma variedade de fatores como os sintomas clínicos, peso do indivíduo, se outros fármacos foram administrados. O versado na técnica irá reconhecer que a via de administração irá variar dependendo da doença ou condição que será tratada.

[00083] A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz do novo polipeptídeo, de acordo com essa invenção, irá depender amplamente das características particulares do paciente, via de administração, e da natureza da doença que será tratada. As instruções gerais podem ser encontradas, por exemplo, nas publicações da International Conference on Harmonisation e em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, capítulos 27 e 28, pp. 484-528 (18th ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990). Mais especificamente, a determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz irá depender de tais fatores como toxicidade e eficácia do medicamento. A toxicidade pode ser determinada utilizando métodos bem conhecidos na técnica e encontrados nas referências anteriores. A eficácia pode ser determinada utilizando as mesmas instruções em conjunto com os métodos descritos abaixo nos Exemplos.

Métodos de Diagnóstico

[00084] Os anticorpos contra mesotelina podem ser usados para detectar a presença de tumores de expressão de mesotelina. A presença de células contendo mesotelina dentro de várias amostras biológicas, inclusive soro, próstata e outros espécimes de biópsia tecidual, pode ser detectada com anticorpos contra mesotelina. Ademais, os anticorpos contra mesotelina podem ser usados em várias metodologias de imagem como imunocintigrafia com um anticorpo conjugado ^{99m}Tc (ou outro isótopo). Por exemplo, um protocolo de imagem similar àquele recentemente descrito utilizando um anticorpo anti-PSMA conjugado ^{111}In pode ser usado para detectar carcinomas pancreáticos ou ovarianos (Sodee et al., Clin. Nuc. Med. 21: 759-766, 1997). Outro método de detecção que pode ser usados é a tomografia por emissão de pósitrons (veja Herzog et al., J. Nucl. Med. 34:2222-2226, 1993).

Composições Farmacêuticas e Administração

[00085] A presente invenção também se refere a composições farmacêuticas que podem compreender anticorpos contra mesotelina, por si só ou em combinação com pelo menos um outro agente, como composto estabilizante, que pode ser administrado em qualquer veículo farmacêutico biocompatível estéril, inclusive, porém sem caráter limitativo, solução salina, solução salina tamponada, dextrose e água. Qualquer uma dessas moléculas pode ser administrada a um paciente separada ou em combinação com outros agentes, fármacos ou hormônios, em composições farmacêuticas onde essas são misturadas com excipiente(s) ou veículos farmaceuticamente aceitáveis. Em uma modalidade da presente invenção, o veículo farmaceuticamente aceitável é farmaceuticamente inerte.

[00086] A presente invenção também se refere à administração de composições farmacêuticas. Tal administração é realizada de forma oral ou parenteral. Os métodos de aplicação parenteral incluem

administração tópica, intra-arterial (diretamente ao tumor), intramuscular, subcutânea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal ou intranasal. Além dos ingredientes ativos, essas composições farmacêuticas podem conter veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados que compreendem excipientes e auxiliares que facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações que podem ser farmacêuticamente usadas. Detalhes adicionais sobre técnicas de formulação e administração podem ser encontrados na última edição de Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.).

[00087] As composições farmacêuticas para administração oral podem ser formuladas utilizando veículos farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica em dosagens adequadas para administração oral. Tais veículos permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas fluidas, suspensões e similares, para ingestão pelo paciente.

[00088] As preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas através da combinação de compostos ativos com excipiente sólido, opcionalmente moendo uma mistura resultante, e processando a mistura de grânulos, após adicionar auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drágeas. Os excipientes adequados são cargas de carboidrato ou proteína como açúcares, inclusive lactose, sucrose, manitol ou sorbitol; amido de milho, trigo, arroz, batata, ou outras plantas; celulose como celulose de metila, hidróxi propil metil celulose, ou carbóxi metil celulose de sódio; e gomas inclusive arábica e tragacanto; e proteínas como gelatina e colágeno. Se desejado, agentes desintegrantes ou solubilizantes podem ser adicionados, como a polivinil pirrolidona reticulada, ágar, ácido algínico, ou um sal dos mesmos, como alginato de sódio.

[00089] Os núcleos das drágeas são fornecidos com revestimentos adequados como soluções de açúcar concentradas, que também podem conter goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietileno glicol e/ou dióxido de titânio, soluções de laca, e solventes orgânicos adequados ou misturas de solvente. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos comprimidos ou revestimentos de drágeas para identificação de produto ou para caracterizar a quantidade de composto ativo, ou seja, dosagem.

[00090] As preparações farmacêuticas que podem ser usadas oralmente incluem cápsulas de encaixe feitas de gelatina, bem como cápsulas seladas e macias feitas de gelatina e um revestimento como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de encaixe podem conter ingredientes ativos misturados com uma carga ou aglutinantes como lactose ou amidos, lubrificantes como talco ou estearato de magnésio, e opcionalmente, estabilizantes. Em cápsulas macias, os compostos ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, como óleos graxos, parafina líquida ou polietileno glicol líquido com ou sem estabilizantes.

[00091] As formulações farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas de compostos ativos. Para injeção, as composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas em soluções aquosas, de preferência, em tampões fisiologicamente compatíveis como solução de Hank, solução de Ringer, ou solução salina fisiologicamente tamponada. As suspensões de injeção aquosa podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, como carbóxi metil celulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Adicionalmente, as suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas adequadas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos como óleo de gergelim, ou ésteres de ácido graxo sintéticos, como oleato de

etila ou triglicerídeos, ou lipossomas. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizantes ou agentes adequados que aumentam a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

[00092] Para administração tópica ou nasal, penetrantes adequados para a barreira particular que será penetrada são usados na formulação. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica.

Kits

[00093] A invenção refere-se adicionalmente a pacotes e kits farmacêuticos que compreendem um ou mais recipientes carregados com um ou mais ingredientes das composições anteriormente mencionadas da invenção. Uma notificação pode estar associada a tal(tais) recipiente(s) sob a forma prescrita por uma entidade governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, refletindo a aprovação pela entidade da fabricação, uso ou venda do produto para administração em seres humanos.

[00094] Em outra modalidade, os kits podem conter sequências de DNA que codificam os anticorpos da invenção. De preferência, as sequências de DNA que codificam esses anticorpos são fornecidas em um plasmídeo adequado para transfecção e expressão por uma célula hospedeira. O plasmídeo pode conter um promotor (geralmente um promotor induzível) para regular a expressão do DNA na célula hospedeira. O plasmídeo também pode conter sítios de restrição adequados para facilitar a inserção de outras sequências de DNA no plasmídeo para produzir vários anticorpos. Os plasmídeos também podem conter inúmeros outros elementos para facilitar a clonagem e expressão das proteínas codificadas. Tais elementos são bem conhecidos pelos versados na técnica e incluem, por exemplo, marcadores selecionáveis, códons de iniciação, códons de terminação e similares.

Fabricação e Armazenamento.

[00095] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser fabricadas de maneira conhecida na técnica, por exemplo, por meio de processos de mistura, dissolução, granulação, fabricação de drágeas, levigação, emulsificação, encapsulação, aprisionamento ou liofilização.

[00096] A composição farmacêutica pode ser fornecida como um sal e pode ser formada com ácidos, inclusive, porém sem caráter limitativo, clorídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Os sais tendem a ser mais solúveis em solventes aquosos ou outros solventes protônicos que são as formas de base livre correspondentes. Em outros casos, a preparação preferida pode ser um pó liofilizado em 1 mM-50 mM de histidina, 0,1%-2% de sucrose, 2%-7% de manitol a uma faixa de pH de 4,5 a 5,5 que é combinada com tampão antes do uso.

[00097] Após as composições farmacêuticas que compreendem um composto da invenção formulado em um veículo aceitável serem preparadas, essas podem ser colocadas em um recipiente adequado e marcadas para tratamento de uma condição indicada. Para administração de anticorpos contra mesotelina, tal marcação poderia incluir quantidade, frequência e método de administração.

Dose Terapeuticamente Eficaz.

[00098] As composições farmacêuticas adequadas para uso na presente invenção incluem composições onde os ingredientes ativos estão contidos em uma quantidade eficaz para atingir o propósito pretendido, ou seja, tratamento de um estado de doença particular caracterizado por expressão de mesotelina. A determinação de uma dose eficaz está dentro da capacidade dos versados na técnica.

[00099] Para qualquer composto, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente em ensaios de cultura celular, por exemplo, células neoplásicas, ou em modelos animais, geralmente

camundongos, coelhos, cães ou porcos. O modelo animal também é usado para obter uma faixa de concentração e via de administração desejadas. Tais informações podem ser então usadas para determinar doses e vias úteis de administração em seres humanos.

[000100] Uma dose terapeuticamente eficaz refere-se àquela quantidade de proteína ou seus anticorpos, antagonistas, ou inibidores que melhoram os sintomas ou condição. A eficácia e a toxicidade terapêutica de tais compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais experimentais, por exemplo, ED_{50} (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população) e LD_{50} (a dose letal para 50% da população). A razão de dose entre os efeitos terapêuticos e tóxicos é o índice terapêutico, e essa pode ser expressa como a razão, ED_{50}/LD_{50} . As composições farmacêuticas que exibem grandes índices terapêuticos são preferidas. Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura celular e estudos em animais são usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso humano. A dosagem de tais compostos está, de preferência, dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem o ED_{50} com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem varia dentro dessa faixa dependendo da forma de dosagem empregada, da sensibilidade do paciente e da via de administração.

[000101] A dosagem exata é selecionada pelo médico em vista do paciente que será tratado. A dosagem e a administração são ajustadas para fornecer níveis suficientes da porção ativa ou para manter o efeito desejado. Fatores adicionais que podem ser levados em consideração incluem a gravidade do estado da doença, por exemplo, tamanho e local do tumor; idade, peso e sexo do paciente; dieta, tempo e frequência de administração, combinação(ões) de fármaco, sensibilidades da técnica de reação, e tolerância/resposta à terapia. As composições farmacêuticas de longa ação devem ser administradas a cada 3 a 4 dias,

semanalmente, ou uma vez a cada duas semanas dependendo da meia-vida e taxa de depuração da formulação particular.

[000102] As quantidades de dosagem normais podem variar de 0,1 a 100.000 microgramas, até uma dose total de cerca de 1 g, dependendo da via de administração. Instruções com relação às dosagens e métodos particulares de administração são fornecidas na literatura. Veja Patente U.S. No. 4.657.760; 5.206.344; ou 5.225.212. Os versados na técnica irão empregar formulações diferentes de polinucleotídeos das proteínas ou seus inibidores. Similarmente, a aplicação de polinucleotídeos ou polipeptídeos será específica para células, condições, locais particulares, etc. As atividades específicas preferidas para um anticorpo radiomarcado podem variar de 0,1 a 10 mCi/mg de proteína (Riva et al., Clin. Cancer Res. 5:3275s-3280s, 1999; Wong et al., Clin. Cancer Res. 6:3855-3863, 2000; Wagner et al., J. Nuclear Med. 43:267-272, 2002).

[000103] A presente invenção é adicionalmente descrita pelos seguintes exemplos. Os exemplos são fornecidos apenas para ilustrar a invenção a título de referência às modalidades específicas. Essas exemplificações, embora ilustrem determinados aspectos específicos da invenção, não descrevem as limitações ou limitam o escopo da invenção descrita.

[000104] Todos os exemplos foram realizados utilizando técnicas-padrão, que são bem conhecidas e comuns para os versados na técnica, exceto onde, de outro modo, descrito em detalhes. Técnicas de biologia molecular rotineiras dos exemplos a seguir podem ser realizadas como descrito em manuais de laboratório padrão, como Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Geração de Anticorpos de Bibliotecas HuCAL

[000105] Para a geração de anticorpos terapêuticos contra mesotelina, foram realizadas seleções com a biblioteca apresentada em fagos MorphoSys HuCAL GOLD. HuCAL GOLD® é uma biblioteca Fab baseada no conceito HuC AL® (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. (2000) 296(1): 57; Krebs, B., et al., J. Immunol. Methods. (2001) 254(1-2): 67), onde todas as seis CDRs são diversificadas, essa emprega a tecnologia CysDisplay® para ligar fragmentos Fab à superfície de fago (Löhning, 2001; WO 01/05950).

A. Resgate de fagomídeo, amplificação e purificação de fagos

[000106] A biblioteca de fagomídeos HuCAL GOLD® foi amplificada em 2 x meio TY contendo 34 µg/ml de cloranfenicol e 1 % de glicose (2 x TY-CG). Após a infecção por fagos auxiliares (VCSM13) em um OD600 de 0,5 (30 min a 37°C sem agitação; 30 min a 37°C com agitação em 250 rpm), as células foram giradas para baixo (4120 g; 5 min; 4°C), ressuspensas em 2 x TY / 34 µg/ml de cloranfenicol / 50 µg/ml de canamicina e desenvolvidas durante a noite a 22°C. Os fagos foram precipitados por PEG a partir do sobrenadante, ressuspensos em PBS / 20% de glicerol e armazenados a -80°C. A amplificação de fagos entre duas séries de separações foi realizada da seguinte maneira: as células TG1 de fase de log intermediário foram infectadas com fagos eluídos e semeados em ágar LB suplementado com 1% de glicose e 34 µg/ml de cloranfenicol (LB-CG). Após a incubação durante a noite a 30°C, as colônias foram removidas por raspagem, ajustadas a um OD600 de 0,5 e fago auxiliar adicionado como descrito acima.

B. Separações com HuCAL GOLD®

[000107] Para as seleções, os fagos de anticorpo HuCAL GOLD® foram divididos em três grupos que correspondem a genes principais VH diferentes (grupo 1: VH1/5λκ, grupo 2: VH3 λκ; grupo 3: VH2/4/6 λκ). Esses grupos foram individualmente pré-absorvidos em células CHO-K1 mesotelina-negativas para depleção de fagos anticorpos irrelevantes

e subsequentemente submetidas 3 séries de alternância de placa celular total em células CHO-A9 e NCI-H226 de expressão de mesotelina seguido por eluição de pH. Por fim, os fagos de anticorpos restantes foram usados para infectar as células TG1 *E. coli*. Após a centrifugação, o pélete bacteriano foi ressuspenso em 2 x meio TY, semeado em placas ágar e incubado durante a noite a 30°C. Os clones selecionados foram então raspados das placas, os fagos foram recuperados e amplificados. A segunda e a terceira séries de seleções foram realizadas como uma inicial.

[000108] As inserções de codificação de Fab dos fagos HuCAL GOLD® selecionados foram subclonadas no vetor de expressão pMORPH®x9_Fab_FS (Rauchenberger, R., et al, J. Biol. Chem. (2003) 278(40): 38194) para facilitar a rápida expressão de Fab solúvel. O DNA dos clones selecionados foi digerido com XbaI e EcoRI cortando assim a inserção de codificação de Fab (ompA-VLCL e phoA-Fd), e clonado no vetor cortado XbaI/EcoRI pMORPH®x9_Fab_FS. O Fab expresso nesse vetor transporta dois marcadores C-terminal (FLAG® e Strep-tag® II) para detecção e purificação.

C. Maturação de afinidade de Fab selecionado por troca gradual de cassetes de CDR

[000109] Para aumentar a afinidade e a atividade biológica de fragmentos de anticorpo selecionados (MF-L, MF-A, MF-J, MF-T e MF-226), as regiões L-CDR3 e H-CDR2 foram otimizadas em paralelo por mutagênese de cassete utilizando mutagênese trinucleotídeo dirigida (Vimekas et al, Nucleic Acids Res. 22(25): 5600-7), enquanto as regiões de estrutura foram mantidas constantes (WO2006122797). As placas de seleção de fragmentos Fab apresentados em fagos de alta afinidade foram preparadas em mesotelina recombinante biotinilada purificada (mesotelina humana ou murina) ou diretamente em linhagens celulares de expressão de mesotelina (NCI-H226 ou OVCAR-3). Combinações

dessas estratégias diferentes de separação também foram aplicadas ao longo das três séries de separação que foram realizadas.

Exemplo 2: Agrupamento de Epitopos

[000110] Os experimentos de agrupamento de epitopos foram realizados utilizando Biacore monitorando a ligação simultânea de pares de anticorpos antimesotelina à mesotelina imobilizada. Em suma, o primeiro anticorpo foi covalentemente imobilizado pelo chip sensor através do acoplamento de amina primária utilizando n-hidroxissuccinamida (NHC) e N-etil-N'-dimetilaminopropil carbodi-imida (EDC). Os sítios de ligação não-ocupados sobre a superfície foram então bloqueados com etanol amida. A mesotelina solúvel foi capturada sobre a superfície através do anticorpo imobilizado, portanto, o epitopo do anticorpo de captura é bloqueado para todas as moléculas de mesotelina ligadas. Um segundo anticorpo foi imediatamente passado sobre a superfície para se ligar à mesotelina imobilizada. Dois anticorpos que identificam os epitopos iguais ou sobrepostos não podem se ligar à mesotelina, enquanto os anticorpos com epitopos diferentes são capazes de se ligar. A superfície de anticorpo foi regenerada com glicina, pH 2,8, para remover as proteínas ligadas e então o processo foi repetido com outros anticorpos. Todas as combinações de sete anticorpos foram testadas. Resultados representativos utilizando MF-T e diversos outros anticorpos são mostrados na figura 1A. O uso de MF-T como o segundo anticorpo serviu como um controle positivo e anti-FLAG serviu como um controle negativo. A figura 1B mostra um resumo dos resultados de ligação em pares de sete anticorpos antimesotelina em um diagrama Venn com círculos representando epitopos individuais. Os círculos sobrepostos representam epitopos sobrepostos. MF428 compete pela ligação com todos os outros anticorpos testados. MF-J e MF-T se ligam a epitopos distintos comparados uns com os outros e a MF-A, MF-226 e MF-L, que

parecem competir pela mesma região de epitopo. O anticorpo K1 de camundongo comercialmente disponível se liga a uma região de epitopo diferente daquela identificada por MF-J e MF-T, porém parece compartilhar uma região de epitopo similar a MF-A, MF-L e MF-226.

Exemplo 3: Reatividade Cruzada com mesotelina murina

[000111] Os resultados de Biacore e estudos ELISA que mostram reatividade cruzada de anticorpos da invenção com mesotelina murina são mostrados na Tabela 5. As constantes cinéticas k_{on} e k_{off} foram determinadas com diluições em série do respectivo fragmento Fab purificado que se liga à mesotelina humana ou murina covalentemente imobilizada utilizando o instrumento Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Sweden). A imobilização de antígeno covalente foi realizada por um procedimento de acoplamento EDC-NHS padrão. As medidas cinéticas foram feitas em PBS, pH 7,2 em uma taxa de fluxo de 20 μ l/min utilizando concentração de Fab que varia de 1,5-500 nM. O tempo de injeção de cada concentração foi de 1 min, seguido por 3 min de fase de dissociação. Para regeneração de 5 μ l 10 mM de tampão de glicina, pH 1,8 foi usado. Todos os sensogramas foram ajustados utilizando o software de avaliação BIA 3.1 (Biacore).

Tabela 5: Afinidades de anticorpo antimesotelina monovalente com mesotelina humana e murina (formatos Fab)

Anticorpo (Fab)	Mesotelina humana		Mesotelina murina	
	K_D [M]	k_d [1/s]	K_D [M]	k_d [1/s]
MF-226	$5,8 \times 10^{-8}$	$3,8 \times 10^{-2}$	$1,28 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-1}$
MOR 06626	$6,7 \times 10^{-10}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-9}$	$9,8 \times 10^{-3}$
MOR 06638	$1,6 \times 10^{-8}$	$6,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-7}$	$4,0 \times 10^{-2}$
MF-A	$1,9 \times 10^{-8}$	$7,9 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-1}$
MOR 06657	$9,5 \times 10^{-10}$	$5,5 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-1}$

Exemplo 4: Ligação invariável à mesotelina em linhagens celulares de câncer diferentes

[000112] A figura 2 mostra estudos imunológicos de linhagens celulares que expressam mesotelina geradas com anticorpo antimesotelina MF-J (A) e MOR 06635 (B). Em suma, os extratos celulares foram gerados por um protocolo de lise padrão mediante a sonicação das células durante 3 min na presença de DNase e RNase. As proteínas celulares foram separadas por SDS-PAGE sob condições desnaturantes e redutoras, manchadas em membranas de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo primário adequado (MF-J-IgG ou MOR 06635-Fab). O anticorpo secundário acoplado à peroxidase IgG anti-humano foi usado para detecção, que foi realizada com o substrato ECL. Embora apenas uma faixa tenha aparecido quando os extratos de células OVCAR-3 foram manchados com anticorpos contra mesotelina, múltiplas faixas foram observadas em células CHO-A9 e NCI-H226. Isso indica a presença de diferentes isoformas de mesotelina em linhagens celulares OVCAR-3, CHO-A9 e NCI-H226. Visto que OVCAR-3 e CHO-A9 expressam a mesma variante de transcrição completamente unida (Muminova, Z.E., et al., BMC Cancer (2004) 4:19), e SEQ ID 371, as múltiplas faixas devem ser induzidas por modificações traducionais ou pós-traducionais, que devem consistir em, porém sem caráter limitativo, por exemplo, diferenças em padrões de glicosilação.

[000113] A Tabela 6 mostra que os valores EC50 obtidos por titulação de FACS de anticorpos maduros por afinidade representativos da invenção em células NCI-H226 e OVCAR-3 não variam significativamente em um subconjunto de IgGs (ou seja, MOR07265, -6631, -6669, -7111, -6640, -6642) enquanto outros IgGs mostram um valor EC50 mais de oito vezes maior em OVCAR-3 do que NCI-H226 (ou seja, MOR06626, -6638, -6657, -6643). Os IgGs mais notáveis MOR07265, -6631, -6635, -6669, -7111, -6640, -6642 são derivados de

maturação de afinidade de IgG parental MF-J, indicando que esses IgGs se ligam a um epítipo relacionado que está invariavelmente presente em células OVCAR-3 bem como NCI-H226. Assim, esses dados demonstram a qualidade de ligação invariável fornecida na presente invenção.

[000114] A titulação de FACS foi realizada em uma placa microtítulo de 96 poços, onde as diluições em série do anticorpo primário em um volume de 80 µl de tampão FACS (3% de FCS, 0,02% de NaN₃ em PBS) foram misturadas com 20 µl de uma suspensão celular que consiste em 10⁶ células/ml que foram separadas com accutase ou tripsina/EDTA, e ressuspensas em tampão FACS. A incubação foi realizada a 4°C durante 1 hora com agitação. As células foram lavadas duas vezes com tampão FACS e ressuspensas em 100 µl/poço de solução conjugada de PE anti-humano em tampão FACS. A incubação e lavagem foram realizadas como anteriormente descrito. A análise de anticorpos ligados a células foi realizada utilizando o dispositivo de Arranjo FACS. Os valores EC₅₀ foram determinados a partir de médias de fluorescência de duplicatas utilizando o software Prism 4.0 (GraphPad) aplicando ajuste por regressão não-linear.

Tabela 6: Titulação de FACS de anticorpos IgG em células NCI-H226 e OVCAR-3

Anticorpo (IgG)	EC ₅₀ [nM]		EC ₅₀ x vezes diferente em OVCAR-3 vs. NCI-H226
	NCI-H226	OVCAR-3	
MOR06626	0,44	9,68	22,0
MOR06638	0,19	4,19	22,1
MOR07265	1,11	1,06	1,0
MOR06631	2,02	0,96	0,5
MOR 06669	0,41	1,40	3,4

Anticorpo (IgG)	EC ₅₀ [nM]		EC ₅₀ x vezes diferente em OVCAR-3 vs. NCI-H226
	NCI-H226	OVCAR-3	
MOR07111	0,80	1,35	1,7
MOR06640	0,63	0,53	0,8
MOR06642	0,58	0,54	0,9
MOR006657	0,14	0,53	14
MOR06643	0,23	1,86	8,1

Exemplo 5: Ligação à mesotelina na presença de antígeno associado ao câncer 125 (CA125)

[000115] A figura 3 mostra que o antígeno associado ao câncer 125 (CA125) liga-se à mesotelina, que por sua vez é ligada a um subconjunto de anticorpos contra mesotelina inclusive MOR06640 e MF-T, enquanto outros anticorpos, como MF-226, competem com CA125 para ligação à mesotelina. Os dados mostrados são unidades relativas de luz (RLU) detectadas por SECTOR Light Imager (Meso Scale Discovery). As placas foram revestidas com anticorpo contra mesotelina mostrado em 15 µg/ml, e lavadas e bloqueadas após cada incubação subsequente. A mesotelina foi adicionada nas concentrações indicadas e tituladas a partir de 10 µg/ml a 0,08 µg/ml. As placas foram subsequentemente incubadas com CA125 (Lee Biosolutions, Cat No. 150-11, 50 000 U/ml diluídos em 1:300). A detecção foi realizada com um anticorpo anti-CA125 de camundongo e um anticorpo Fab anticamundongo marcado por marcador MSD Sulfo (Meso Scale Discovery). Um anticorpo de controle humano não-específico foi revestido com um controle. Os controles adicionais incluíram a configuração de ensaio total com mesotelina nas concentrações mais altas testadas (10 µg/ml) e a omissão de CA125 ou o anticorpo anti-CA125 de camundongo, ou configuração de ensaio total sem mesotelina. Esse exemplo mostra que

os anticorpos, fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno, ou variantes dos mesmos, que se ligam de maneira invariável à mesotelina podem ser identificados por teste *in vitro*.

Exemplo 6: Internalização

[000116] A internalização relativa de anticorpos antimesotelina em células CHO-A9 é mostrada na figura 4. Em suma, as células CHO-A9 que expressam a proteína mesotelina foram marcadas com anticorpos ¹²⁵I-antimesotelina durante 2 horas a 0°C, para ligar o anticorpo marcado à mesotelina de superfície celular. A baixa temperatura inibiu a internalização. O anticorpo não-ligado foi lavado utilizando tampão frio e as alíquotas individuais de células marcadas foram colocadas em um banho de água a 37°C para iniciar a internalização. Um curso de tempo foi decorrido onde amostras em triplicata foram coletadas em: 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Em cada ponto de tempo, as amostras foram centrifugadas em péletes celulares e o sobrenadante foi coletado, essas continham o anticorpo que foi dissociado das células. O pélete celular foi então brevemente lavado com ácido (PBS + 1% de glicose pH 1,0) para remover o anticorpo marcado ligado à superfície celular, e então peletizado por centrifugação. O sobrenadante, contendo anticorpo eluído da superfície celular foi coletado. A fração de pélete, contendo o anticorpo internalizado, foi coletada separadamente. Após o término do curso de tempo, a radioatividade em cada fração de todos os pontos de tempo foi determinada utilizando um contador gama. A porcentagem de contagens totais presentes nas frações representa a porcentagem do anticorpo que foi dissociado, ligado à superfície celular ou internalizado em cada ponto de tempo. Em experimentos onde um segundo anticorpo (Fc IgG anti-humano de cabra, ou Fc IgG anticamundongo de cabra, respectivamente) foi adicionado juntamente com o anticorpo marcado primário para reticular e, do mesmo modo, estabilizar o anticorpo ligado à superfície celular, taxas de dissociação de anticorpo muito menores

foram observadas comparadas com células tratadas apenas com o anticorpo primário. Níveis de internalização correspondentemente maiores também foram obtidos para todos os anticorpos testados com o segundo anticorpo. Na ausência de um segundo anticorpo, as dissociações relativamente rápidas dos anticorpos, como observado nos estudos de Biacore, reduziram o tempo de residência dos anticorpos sobre a superfície celular de modo que a internalização seja significativamente reduzida. Portanto, quatro anticorpos candidatos foram selecionados para maturação de afinidade de modo a obter anticorpos progenitores com taxas de dissociação reduzidas.

Tabela 7: Sequências dos anticorpos

Anticorpo	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	Proteína VH	Proteína VL	Nucleotídeo VH	Nucleotídeo VL
	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
MF-J	1	31	67	99	129	160	198	241	284	327
MOR 07265	1	32	67	99	129	161	199	242	285	328
MOR 06631	1	32	67	99	129	160	200	243	286	329
MOR 06669	1	33	67	99	129	160	201	244	287	330
MOR 07111	1	31	67	99	129	162	202	245	288	331
MOR 06640	1	31	67	99	129	161	203	246	289	332
MOR 06642	1	31	67	99	129	163	204	247	290	333
MOR 06643	2	34	68	100	130	164	205	248	291	334
MF-226	3	35	69	101	131	165	206	249	292	335
MOR 06626	3	36	69	101	131	165	207	250	293	336
MOR 06635	1	37	67	99	129	160	208	251	294	337
MOR 06638	3	35	69	101	131	166	209	252	295	338

Anticorpo	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	Proteína VH	Proteína VL	Nucleotídeo VH	Nucleotídeo VL
	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
MF-A	4	38	70	102	132	167	210	253	296	339
MOR 06657	4	38	70	102	132	168	211	254	297	340
MF-T	5	39	71	103	133	169	212	255	298	341
MF-L	2	34	68	100	130	170	213	256	299	342
MF-1	6	40	72	104	134	171	214	257	300	343
MF-5	7	41	73	105	135	172	215	258	301	344
MF-8	8	42	74	106	136	173	216	259	302	345
MF-24	9	43	75	107	137	174	217	260	303	346
MF-25	10	44	76	108	138	175	218	261	304	347
MF-27	1	45	77	109	139	176	219	262	305	348
MF-73	11	46	78	110	140	177	220	263	306	349
MF-78	12	47	79	111	141	178	221	264	307	350
MF-84	13	48	80	112	142	179	222	265	308	351
MF-101	14	49	81	113	143	180	223	266	309	352
MF-230	15	50	82	117	144	181	224	267	310	353

Anticorpo	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	Proteína VH	Proteína VL	Nucleotídeo VH	Nucleotídeo VL
	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
MF-236	16	51	83	115	145	182	225	311	354	
MF-252	17	52	84	116	146	183	226	312	355	
MF-275	17	53	85	117	147	184	227	313	356	
MF-423	18	54	86	118	148	185	228	314	357	
MF-427	19	55	87	119	149	186	229	315	358	
MF-428	20	56	88	120	150	187	230	316	359	
MF-C	21	57	89	121	151	188	231	317	360	
MF-I	22	58	90	102	152	189	232	318	361	
MF-M	23	59	91	122	153	190	233	319	362	
MF-P	24	60	92	123	154	191	234	320	363	
MF-Q	25	61	93	124	155	192	235	321	364	
MF-S	26	62	94	125	156	193	236	322	365	
MF-U	27	63	95	126	157	194	237	323	366	
MF-V	28	64	96	127	158	195	238	324	367	
MF-W	29	65	97	102	159	196	239	325	368	
MF-Y	30	66	98	128	155	197	240	326	369	

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo sintético humano ou humanizado isolado ou um fragmento funcional do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região de ligação ao antígeno que é específica para Mesotelina (SEQ ID NO:370), em que o dito anticorpo ou fragmento funcional do mesmo reconhece um epítipo de mesotelina que não é mascarado pelo antígeno 125 do câncer (CA125), e em que a referida região de ligação de anticorpo compreende uma HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 em que:

- a) HCDR1 é SEQ ID NO: 5,
- b) HCDR2 é SEQ ID NO: 39,
- c) HCDR3 é SEQ ID NO: 71,
- d) LCDR1 é SEQ ID NO: 103,
- e) LCDR2 é SEQ ID NO: 133 e
- f) LCDR3 é SEQ ID NO: 169.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 212.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos variável da cadeia leve:

DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVSWYQQ
HPGKAPKLMYGVNNRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEAD
YYCSSYDIESATPVFGGGTKLTVLGQ.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é uma IgG.

5. Fragmento funcional, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é um fragmento de anticorpo Fab ou scFv.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de

que compreende um anticorpo ou fragmento funcional, como definido na reivindicação 1, e um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável.

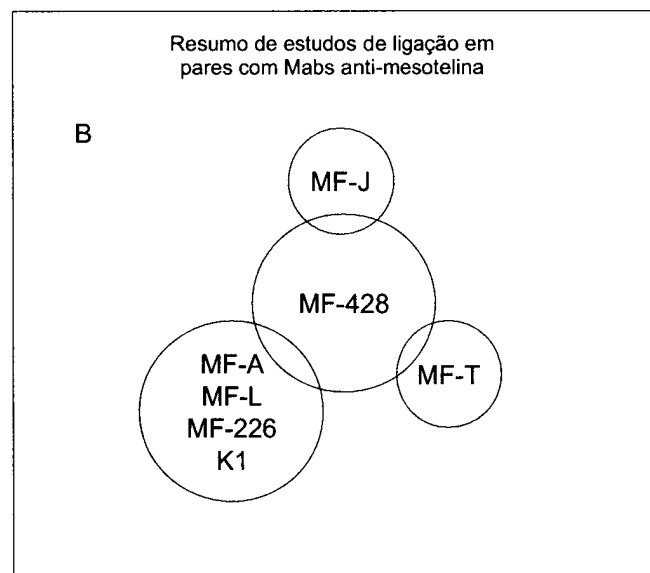
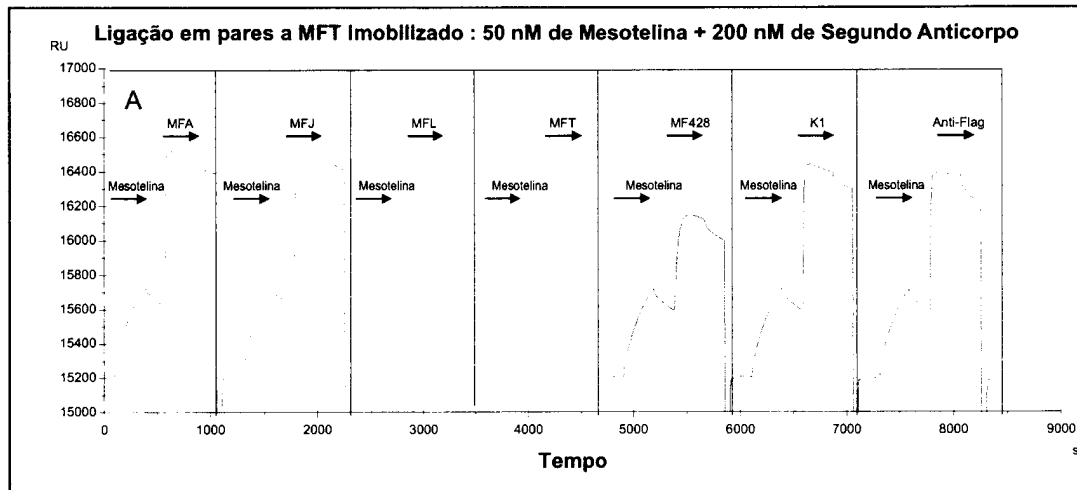


Fig. 1

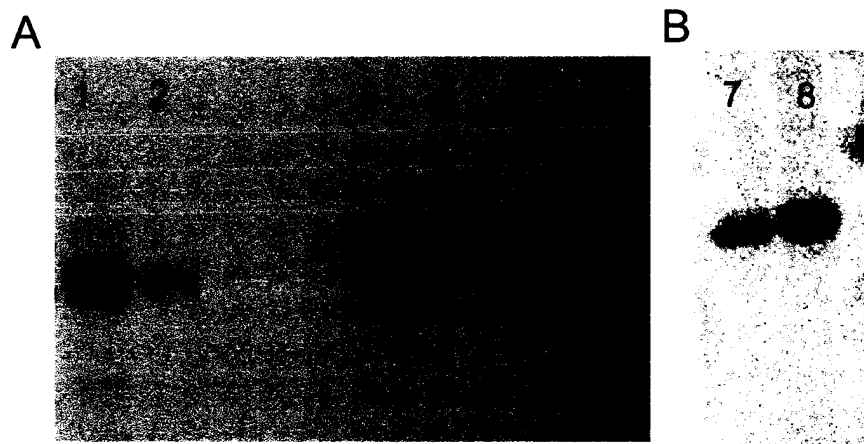


Fig. 2

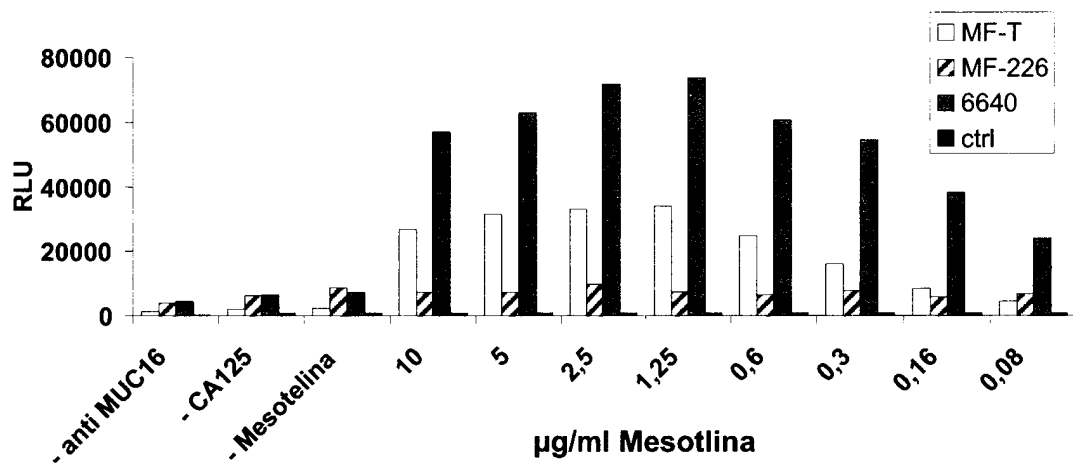
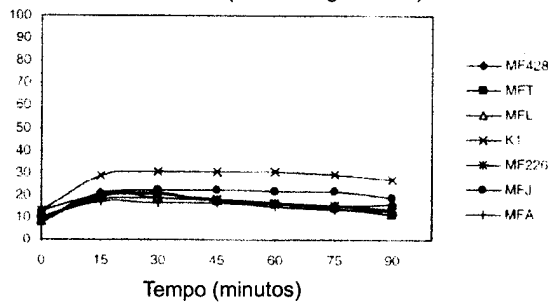
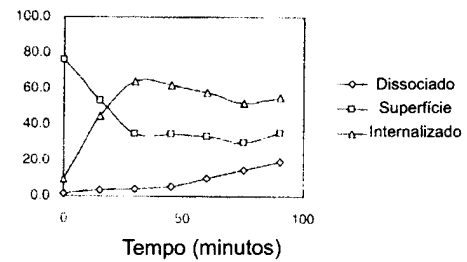


Fig. 3

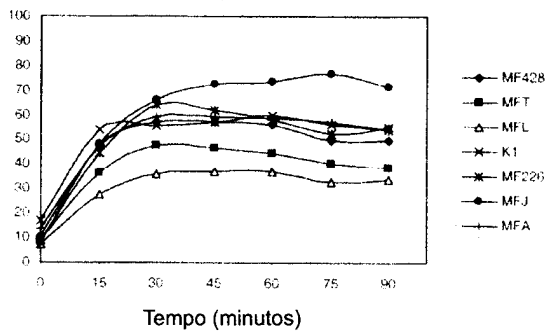
A Internalização relativa de Mabs anti-mesotelina (menos segundo Ab)



C Internalização de 125 I-MF-226 (1 ug/ml) em células CHO-A9 (mais segundo anticorpo)



B Internalização relativa de Mabs anti-mesotelina (mais segundo Ab)



D Internalização de 125 I-MF-226 em células CHO-A9 (mais segundo anticorpo)

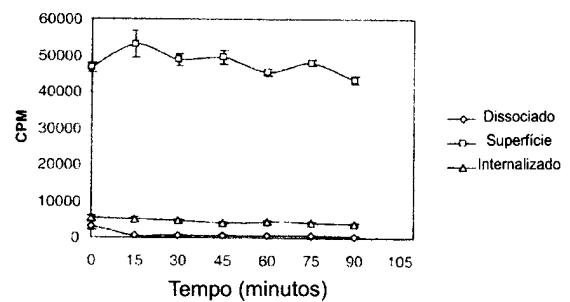


Fig. 4