

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 527**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010 E 10721207 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2424896**

54 Título: **Anticuerpos anti-CEACAM1 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**30.04.2009 US 213040 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.03.2016**

73 Titular/es:

**TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH  
INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD. (50.0%)  
The Chaim Sheba Medical Center Tel HaShomer  
52 621 Ramat Gan, IL y  
RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARKEL, GAL;  
ORTENBERG, RONA y  
SCHACHTER, JACOB**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 563 527 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**Anticuerpos anti-CEACAM1 y métodos de uso de los mismos****DESCRIPCIÓN****5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a anticuerpos anti-CEACAM1, células de hibridoma que producen los mismos y métodos de uso de los mismos.

10 La proteína transmembranaria CEACAM1 [también conocida como glicoproteína biliar (BGP), CD66a y C-CAM1] es un miembro de la familia del antígeno carcinoembrionario (CEA) que también pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulina. CEACAM1 interacciona con otras proteínas CD66 conocidas, que incluyen proteínas CD66a, CD66c y CD66e. Se expresa en un amplio espectro de células, que oscilan de células epiteliales a aquellas de origen hemopoyético (por ejemplo, células inmunitarias).

15 Se han atribuido muchas funciones diferentes a la proteína CEACAM1. Se mostró que la proteína CEACAM1 presentaba propiedades antiproliferativas en carcinomas de colon, próstata, además de otros tipos de cáncer. Datos adicionales soportan la participación central de CEACAM1 en la angiogénesis y metástasis. CEACAM1 también desempeña una función en la modulación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Por ejemplo, se mostró que CEACAM1 era un receptor inhibitor para linfocitos T activados contenido dentro del epitelio intestinal humano [véase el documento WO99/52552 y Morales et al. J. Immunol. 163 (1999), 1363-1370]. Informes adicionales han indicado que el compromiso de CEACAM1 tanto por reticulación de TCR con mAb como por proteínas Opa de *Neisseria gonorrhoeae* inhibe la activación y proliferación de linfocitos T.

25 El melanoma es un tumor maligno de las células productoras de pigmento (melanocitos), responsable del 75 % de la incidencia relacionada con el cáncer de piel en el mundo, principalmente debido a amplias metástasis. El melanoma metastásico (MM) responde débilmente a la mayoría de las pautas anticáncer y la media de supervivencia global para pacientes con MM es 8,5 meses. CEACAM1 raramente se expresa por melanocitos normales, pero frecuentemente se encuentra en células de melanoma. La expresión de CEACAM1 en lesiones de melanoma cutáneo primario predice fuertemente el desarrollo de enfermedad metastásica con mal pronóstico. Además, la elevada expresión de CEACAM1 se observó en células NK derivadas de algunos pacientes con melanoma metastásico en comparación con donantes sanos.

35 El documento WO2007/063424 y la solicitud de patente de EE.UU. N° 20070110668 desvelan métodos de regulación del sistema inmunitario, y en particular métodos para la regulación de una respuesta inmunitaria específica, que incluyen la regulación de la actividad de linfocitos. Estos métodos comprenden tanto la modulación negativa como positiva de la función de proteínas CEACAM1.

40 La solicitud de patente de EE.UU. N° 20070071758 desvela métodos y composiciones para el tratamiento y diagnóstico de cánceres. Específicamente, la solicitud de patente de EE.UU. N° 20070071758 enseña métodos y composiciones para potenciar la eficacia de la terapia de linfocitos infiltrantes en tumor (TIL) en el tratamiento de cáncer modulando negativamente la actividad de la proteína CEACAM1, tal como, por ejemplo, usando una inmunoglobulina específica para CEACAM1.

45 La solicitud de patente de EE.UU. N° 20080108140 desvela métodos de modulación de las respuestas inmunitarias específicas para crear una inmunidad protectora en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades que requieren trasplante de tejido. En particular, la solicitud de patente de EE.UU. N° 20080108140 se refiere a la supresión de respuestas inmunitarias de una manera dirigida, aumentando la concentración funcional de la proteína CEACAM1 en el tejido diana.

50 La solicitud de patente de EE.UU. N° 20040047858 desvela anticuerpos específicos (es decir, 34B1, 26H7 y 5F4) que son capaces de modular la actividad de linfocitos T mediante CEACAM1 y usos de los mismos, tales como en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la respuesta inmunitaria (por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades autoinmunitarias, cánceres, etc.).

55 Las solicitudes de patente de EE.UU. N° 20020028203, 20050169922 y 20080102071 desvelan composiciones que se unen a moléculas de receptores inhibidores de linfocitos T y modulan (es decir, potencian o suprimen) la actividad de linfocitos T (por ejemplo, citotoxicidad y proliferación), tales como agentes de unión a glicoproteína biliar, y métodos de uso de tales composiciones tales como para el tratamiento de enfermedades (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, inmunodeficiencia, cáncer, etc.).

Otra técnica relacionada:

65 5F4 mAb: Regulation of human intestinal intraepithelial lymphocyte cytolytic function by biliary glycoprotein (CD66a) [Morales VM et al., J Immunol. (1999) 163(3):1363-70].  
GM8G5 y 29H2 - ambos comercialmente disponibles de Abcam Inc. [abcamdotcomdotportal](http://abcamdotcomdotportal).

RESUMEN DE LA INVENCION

- 5 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una célula de hibridoma que se ha depositado bajo la ATCC Número de acceso PTA-9974.
- Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que tiene las secuencias de CDR y orientación del anticuerpo producido a partir de la célula de hibridoma.
- 10 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de inmunomodulación, comprendiendo el método poner en contacto un linfocito que expresa CEACAM1 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 15 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de inhibición de la migración o proliferación de una célula tumoral que expresa CEACAM1, comprendiendo el método poner en contacto la célula tumoral que expresa CEACAM1 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, inhibiéndose así la migración o proliferación de una célula tumoral que expresa CEACAM1.
- 20 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de diagnóstico de un cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método poner en contacto una muestra biológica derivada del sujeto con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en el que una formación de complejos más allá de un umbral predeterminado es indicativa del cáncer en el sujeto.
- 25 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de tratamiento de cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tratándose así el cáncer en el sujeto.
- 30 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de inhibición de la interacción proteína-proteína homotípica o heterotípica de CEACAM1, comprendiendo el método poner en contacto un linfocito que expresa CEACAM1 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, inhibiéndose así la interacción proteína-proteína homotípica o heterotípica de CEACAM1.
- 35 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado o fragmento de está unido a un resto citotóxico.
- 40 Según algunas realizaciones de la invención, el resto citotóxico comprende una citotoxina, una quimioterapia, una pro-apoptósica, un interferón, un resto radiactivo, o combinaciones de los mismos.
- Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo está unido a un resto identificable.
- 45 Según algunas realizaciones de la invención, las células del cáncer se caracterizan por expresión en exceso de CEACAM1 en comparación con células sin afectar.
- Según algunas realizaciones de la invención, el método de tratamiento de cáncer comprende además administrar al sujeto linfocitos.
- 50 Según algunas realizaciones de la invención, los linfocitos comprenden linfocitos T o células NK.
- Según algunas realizaciones de la invención, el linfocito que expresa CEACAM1 es un linfocito infiltrante de tumores o célula NK.
- 55 Según algunas realizaciones de la invención, el linfocito que expresa CEACAM1 es un linfocitos T citotóxico.
- Según algunas realizaciones de la invención, la célula tumoral comprende una célula tumoral de melanoma.
- 60 Según algunas realizaciones de la invención, el cáncer es melanoma.
- 65 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que se refiere la invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de las realizaciones de la invención, métodos y/o materiales a modo de ejemplo se describen más adelante. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, que incluye definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser

necesariamente limitantes.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, a modo de ejemplo solo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles particulares mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a aquellos expertos en la materia cómo las realizaciones de la invención pueden ponerse en práctica.

10 En los dibujos:

15 Las FIG. 1A-B representan la especificidad del mAb MRG1. 721.221 linfocitos B parentales transfectados establemente con CEACAM1 (verde), CEACAM5 (rojo), CEACAM6 (púrpura), CEACAM8 (azul) o control (negro) se sometieron a análisis de FACS usando los diferentes anticuerpos anti-CEACAM humana: mAb MRG1 (Figura 1A) y mAb Kat4c (Figura 1B).

20 La FIG. 2 representa una inhibición dependiente de la dosis de interacciones homófilas de CEACAM1 por el mAb anti-CEACAM1 MRG1. El mAb anti-CEACAM1 se añadió a tanto BW/CEACAM1 (células efectoras) como 221/CEACAM1 (células diana) en diversas concentraciones. Tras una hora de incubación sobre hielo se añadieron las células recíprocas (221/CEACAM1 o BW/CEACAM1) y se midió la secreción de IL-2 de ratón por ELISA. 100 % se define como la actividad en ausencia de cualquier anticuerpo. Se presentan los resultados de un experimento representativo de cuatro, cada uno realizado por triplicado.

25 La FIG. 3 representa la abolición de la función inhibidora de CEACAM1. Se pre-incubó el mAb MRG1 con células diana (representadas en gris) o con células efectoras (representadas en blanco). Las células incubadas sin la adición del mAb se representan en negro. Las líneas de melanoma indicadas (526mel, 624mel o 09mel) se usaron como células diana. Se usaron células TIL014 como células efectoras en una relación E:T de 10:1. Tras una hora de incubación sobre hielo se añadieron las células recíprocas y se co-incubaron durante 5 horas a 37 °C. Las células diana se pre-marcaron con colorante fluorescente verde (CFSE) y se determinó la lisis específica por co-tinción con yoduro de propidio (PI) en citometría de flujo. Se restó la muerte espontánea. El ensayo se realizó por triplicado.

30 La FIG. 4 representa el bloque de la invasión del melanoma por el mAb MRG1. Se preincubaron células de melanoma (08mel o 09mel) en ausencia o presencia de 1 µg/ml de mAb MRG1 y a continuación se probaron por ensayo de invasión en Matrigel. La invasión se dejó durante 24 horas y la cantidad de células invasoras se cuantificó con XTT normalizado.

35 La FIG. 5 representa el bloqueo de la proliferación neta de células de melanoma por el mAb MRG1. Se incubaron células de melanoma 526mel con las dosis indicadas (0,5 µg, 1 µg o 3 µg) del mAb MRG1 y la proliferación se monitorizó 2 días o 5 días tras el tratamiento.

40 Las FIG. 6A-B representan la inhibición del crecimiento tumoral humano *in vivo* en ratones SCID por inyecciones sistémicas de MRG1 en comparación con PBS. Se realizaron experimentos en dos sistemas del siguiente modo: Figura 6A: inyecciones simultáneas del anticuerpo (0,5 mg/ratón intraperitonealmente) e inoculación de células cancerosas (5.000.000 células subcutáneamente); Figura 6B: tratamiento de tumores generados en ratones SCID (volumen del tumor de 75 mm<sup>3</sup>) mediante inyecciones de anticuerpo MRG1 (como se indica anteriormente).

45 La FIG. 7 representa la eficacia potenciada en la inhibición del crecimiento tumoral por una combinación de MRG1 con administración intravenosa de TIL reactivo humano en comparación con TIL intravenoso solo.

50 La FIG. 8 representa el efecto superior del mAb MRG1 con respecto a los anticuerpos monoclonales anti-CEACAM1 previamente descritos, además del anticuerpo policlonal de conejo comercialmente disponible dirigido a CEACAM1 humana (DAKO, Glostrup, Dinamarca), como se ha determinado por el ensayo de bloqueo funcional. Se probaron diversos anticuerpos anti-CEACAM1 para bloquear la actividad de CEACAM1, como se ha informado por la secreción de mIL-2. 100 % se definió como actividad en ausencia de cualquier anticuerpo. Se presentan los resultados de un experimento representativo de tres, cada uno realizado por triplicado.

#### DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

55 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere al anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 y células de hibridoma que producen el mismo, además de a métodos de uso del anticuerpo en inmunomodulación y tratamiento del cáncer.

60 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de diversas formas.

65 El presente inventor ha producido mediante una laboriosa experimentación y cribado un anticuerpo monoclonal selectivo para CEACAM1. Se mostró que este anticuerpo era superior a otros anticuerpos monoclonales anti-

CEACAM1, como se demuestra por ensayos de bloqueo funcional.

Como se ilustra en el presente documento más adelante, el anticuerpo MRG1 producido según las presentes enseñanzas es selectivo para CEACAM1 y no reacciona de forma cruzada con otros miembros de la familia de CEACAM (es decir, CEACAM 5, 6 y 8, véase el Ejemplo 2). El anticuerpo inhibe interacciones homófilas de CEACAM1, como se ha determinado por co-incubación de células efectoras inmunitarias y células de melanoma diana y ensayando la secreción de IL-2 y la lisis de células (véase el Ejemplo 3). Además, el anticuerpo se mostró eficaz en inhibir la invasión y proliferación de células de melanoma. Finalmente, la administración *in vivo* del anticuerpo tanto solo como en combinación con linfocitos reactivos se mostró eficaz en inhibir el crecimiento de tumores de melanoma. En conjunto, las presentes enseñanzas sugieren que el anticuerpo MRG1, fragmentos y derivados pueden usarse como herramienta eficaz para la inmunomodulación y tratamiento del cáncer.

Así, según un aspecto de la invención, se proporciona una célula de hibridoma que se ha depositado bajo ATCC Número de acceso PTA-9974.

Según otro aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que tiene los segmentos de CDR y orientación del anticuerpo producido a partir de la célula de hibridoma, descritos anteriormente.

El anticuerpo de las presentes enseñanzas es capaz de unirse a CEACAM1 con una afinidad mínima de  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M.

Como se usa en el presente documento, el término "CEACAM1" se refiere al producto de proteína del gen CEACAM1, por ejemplo, NP\_001020083.1, NP\_001703.2.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente invención, incluye moléculas intactas, además de fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv que son capaces de unirse a macrófagos. Según una realización a modo de ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal tal como se llama en el presente documento, MRG1. Fragmentos funcionales de anticuerpos se definen como sigue: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para dar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para dar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento genéticamente manipulado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y (5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), una molécula genéticamente manipulada que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, enlazadas por un conector polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada.

Como se indica anteriormente, el anticuerpo de la presente invención tiene la misma orientación de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que la del anticuerpo producido por célula de hibridoma, que tiene los detalles de depósito que se han descrito anteriormente. Es decir, CDR1, CDR2, CDR3 están colocadas en la misma orientación sobre las cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>.

Los fragmentos de anticuerpos según la presente invención pueden prepararse por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de célula de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpos por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S indicado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes del Fab' 3.5S. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, las patentes de EE.UU. N° 4.036.945 y 4.331.647, y referencias contenidas en ellas, patentes que se incorporan por este documento por referencia en su totalidad. Véase también Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]. También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, mientras que los fragmentos se unen al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al. [Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables pueden estar enlazadas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por productos químicos tales como glutaraldehído. Preferentemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> conectadas por un conector

peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno monocatenarias (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena de polipéptidos con un péptido conector que conecta los dos dominios V. Métodos para producir sFv se describen, por ejemplo, por [Whitlow y Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271-77 (1993); y la patente de EE.UU. N° 4.946.778, que se incorpora por este documento por referencia en su totalidad.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Pueden obtenerse péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [*Methods*, 2: 106-10 (1991)]. Según algunas realizaciones de la presente invención, las CDR pueden implementarse en cualquier forma de un anticuerpo tal como por el uso de tecnología de ADN recombinante.

Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos que forman una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos con residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de Fv de la región estructural de la inmunoglobulina humana están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las CDR importadas o secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las CDR regiones se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR regiones son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Los métodos de humanización de anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente residuos de importación, que normalmente se toman de un dominio variable de importación. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de expresión en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. Similarmente, los anticuerpos humanos pueden prepararse por la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivo parcialmente o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpo humano, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los respectos, que incluyen transposición de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y a continuación publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo está unido a un resto citotóxico.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo está unido a un resto identificable.

El resto identificable puede ser un miembro de un par de unión, que es identificable mediante su interacción con un

miembro adicional del par de unión y una marca que se visualiza directamente. En un ejemplo, el miembro del par de unión es un antígeno que se identifica por un anticuerpo marcado correspondiente. En un ejemplo, la marca es una proteína fluorescente o una enzima que produce una reacción colorimétrica.

5 La siguiente tabla 1 proporciona ejemplos de secuencias de restos identificables.

**Tabla 1**

Resto identificable	Secuencia de Amino Acidos (Acceso a GenBank)	Secuencia de Acidos Nucleicos (Acceso a GenBank)
Proteína Verde Fluorescente	AAL33912	AF435427
Fosfatasa alcalina	AAK73766	AY042185
Perioxidasa	NP 568674	NM_124071
Etiqueta histidina	AAK09208	AF329457
Etiqueta Myc	AF329457	AF329457
Etiqueta Biotina Ligasa	NP 561589	NC_003366
Proteína Naranja Fluorescente	AAL33917	AF435432
Beta Galactosidasa	NM 125776	NM_125776
Fluoresceína	AAF22695	AF098239
isotiocianato	S11540	S11540

El resto citotóxico o terapéutico puede ser, por ejemplo, un resto citotóxico, un resto tóxico, un resto de citocina, un resto de anticuerpo bi-específico, una citotoxina, una quimiocina, una quimioterapia, una pro-apoptósica, interferón, un resto radiactivo, o combinaciones de los mismos, ejemplos de los cuales se proporcionan más adelante.

La siguiente Tabla 2 proporciona ejemplos de secuencias de restos terapéuticos.

**Tabla 2**

Resto terapéutico	Secuencia de Amino Acidos (Acceso a GenBank)	Secuencia de Acidos Nucleicos (Acceso a GenBank)
exotoxina de Pseudomonas	ABU63124	EU090068
toxina de la difteria	AAV70486	AY820132.1
interleucina 2	CAA00227	A02159
CD3	P07766	X03884
CD16	NP_000560.5	NM_000569.6
interleucina 4	NP_000580.1	NM_000589.2
HLA-A2	P01892	K02883
interleucina 10	P22301	M57627
Toxina de ricino	EEF27734	EQ975183

Se apreciará que tales fusiones pueden efectuarse usando conjugación química o por tecnología de ADN recombinante.

El anticuerpo de la presente invención puede disminuir las interacciones homófilas (u homotípicas) o heterotípicas de CEACAM1 inhibitoras para así aumentar la actividad de linfocitos. Las interacciones homófilas de CEACAM1 se producen mediante el dominio de N. Varios aminoácidos son cruciales para esta interacción, que incluyen R43, Q44, D64 y R82. La interacción produce la fosforilación de un residuo de tirosina citoplásmica que recluta SHP-1 fosfatasa. Esto inicia una cascada inhibitora dentro de los linfocitos, que se dirige a mediadores proximales, tales como ZAP70.

Así, el anticuerpo de la presente invención puede usarse para bloquear CEACAM1 sobre cualquiera o ambas de las células efectoras inmunitarias (linfocitos que expresan CEACAM1, por ejemplo, células infiltrantes de tumor, linfocitos T o células NK) y células diana (por ejemplo, células patológicas que expresan CEACAM1 tales como

células cancerosas). Ejemplos de células cancerosas que son candidatas para esta terapia incluyen, pero no se limitan a, células de melanoma, pulmón, tiroides, mama, colon, próstata, hepáticas, vejiga, renales, cervicales, pancreáticas, de leucemia, linfoma, mieloides, de ovario, de útero, sarcoma, biliares o endometriales.

5 La presente invención también contempla anticuerpos aislados o fragmentos de anticuerpos que compiten para unirse a CEACAM1 con los anticuerpos producidos por la célula de hibridoma anteriormente descrita. Aquellos anticuerpos puede ser anticuerpos humanizados, xenógenos o quiméricos (como se describe en detalle anteriormente) que son adecuados para, por ejemplo, aplicaciones terapéuticas. Un fragmento de anticuerpo del anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fv monocatenario, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un  
10 fragmento F(ab')<sub>2</sub>.

Así, según otro aspecto de la invención, se proporciona un método de conversión de una célula tumoral que expresa CEACAM1 susceptible a inmunomodulación. Comprendiendo el método poner en contacto la célula tumoral que expresa CEACAM1 (por ejemplo, célula de melanoma, pulmón, tiroides, mama, colon, próstata, hepática, de vejiga, renal, cervical, pancreática, de leucemia, linfoma, mieloides, de ovario, útero, sarcoma, biliar o endometrial) con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito anteriormente, convirtiéndose así la célula tumoral que expresa CEACAM1 en susceptible a la inmunomodulación.

Como se usa en el presente documento, "inmunomodulación" se refiere a la inmunomodulación dependiente de linfocitos (por ejemplo, por células NK o linfocitos infiltrantes de tumores).

Adicionalmente o alternativamente, la presente invención también prevé un método de inmunomodulación (por ejemplo, inhibir la interacción proteína-proteína homotípica o heterotípica de CEACAM1), poniendo en contacto un linfocito que expresa CEACAM1 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento.

25 Los métodos de las presentes enseñanzas pueden efectuarse *in vitro*, *ex vivo* (por ejemplo, usado en inmunoterapia adaptativa basada en linfocitos T) o *in vivo*.

Como se ha mencionado, los anticuerpos de algunas realizaciones de la invención pueden tener actividad anticancerígena que es independiente de su actividad inmunomoduladora descrita anteriormente.

Así, las presentes enseñanzas proporcionan adicionalmente un método de inhibición de la migración o proliferación de una célula tumoral que expresa CEACAM1, comprendiendo el método poner en contacto la célula tumoral que expresa CEACAM1 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento, inhibiéndose así la migración o proliferación de una célula tumoral que expresa CEACAM1.

Como se usa en el presente documento, "inhibir" se refiere a al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 100 % de inhibición en la proliferación o migración que puede ensayarse usando métodos que son muy conocidos en la técnica (véase la Sección de ejemplos más adelante).

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse eficazmente para el tratamiento de cáncer.

Así, según otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento, tratándose así el cáncer en el sujeto. Ejemplos de cáncer que pueden diagnosticarse o tratarse según las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, melanoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de cuello uterino, cáncer pancreático, leucemia, linfoma, cáncer relacionado con células mieloides, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer biliar o cáncer endometrial.

Según una realización específica de la presente invención, el cáncer es melanoma.

El término "tratar" se refiere a inhibir, prevenir o detener el desarrollo de una patología (enfermedad, trastorno o afección) y/o causar la reducción, remisión o regresión de una patología. Aquellos expertos en la materia entenderán que pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una patología, y similarmente, pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una patología.

Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" se refiere a evitar que una enfermedad, trastorno o afección se produzca en un sujeto que puede estar en riesgo de la enfermedad, pero que todavía no ha sido diagnosticado con que tiene la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye mamíferos, preferentemente seres humanos de cualquier edad, que padecen la patología. Preferentemente, este término engloba individuos que están en riesgo de desarrollar la patología.

Con el fin de potenciar el tratamiento (por ejemplo, tratamiento del cáncer), linfocitos tales como linfocitos T (por

ejemplo, linfocitos infiltrantes de tumores) o células NK pueden administrarse al sujeto antes de, concomitantemente con o tras la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención. Por consiguiente, pueden obtenerse linfocitos del sujeto (por ejemplo, de la sangre periférica o del tumor del mismo) o de un donante (un donante de linfocitos alógeno o singénico), tratarse por métodos de expansión *ex vivo* de manera que se obtengan linfocitos viables [por ejemplo, por crecimiento sobre capa alimentadora irradiada complementada con IL-2, como se describe previamente en Besser MJ et al., Clin Cancer Res (publicación electrónica antes de impresión) 1 de mayo de 2010 y en Besser MJ et al., Journal of Immunotherapy (publicación electrónica antes de impresión) 1 de abril de 2009, completamente incorporados en el presente documento por referencia] y administrarse al sujeto.

Se apreciará que el sujeto puede tratarse por cualquier otro tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, etc.) antes de la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o antes de la administración de los linfocitos.

El anticuerpo de la presente invención puede administrarse a un organismo por sí mismo, o en una composición farmacéutica en la que se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En el presente documento, el término "principio activo" se refiere al anticuerpo responsable del efecto biológico.

En lo sucesivo, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no abole la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante se incluye bajo estas expresiones.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Técnicas para la formulación y administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, además de inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intracardiácas, por ejemplo, en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Enfoques convencionales para la administración de fármacos al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de la superficie celular endotelial en combinación con un agente que es por sí mismo incapaz de cruzar la BBB) en un intento por explotar una de las vías de transporte endógeno de la BBB; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad de lípidos de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua con vehículos de lípido o colesterol); y la rotura transitoria de la integridad de la BBB por rotura hiperosmótica (resultante de la infusión de una disolución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina). Sin embargo, cada una de estas estrategias tiene limitaciones, tales como los riesgos inherentes asociados a un procedimiento quirúrgico invasivo, una limitación de tamaño impuesta por una limitación inherente en los sistemas de transporte endógeno, efectos secundarios biológicos potencialmente no deseables asociados a la administración sistémica de una molécula quimérica que comprende un motivo de vehículo que podría ser activo fuera del SNC, y el posible riesgo de daño cerebral dentro de regiones del cerebro en las que se rompe la BBB, que lo hace un método de administración inferior al óptimo.

Alternativamente, puede administrarse la composición farmacéutica de una forma local en vez de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido de un paciente.

El término "tejido" se refiere a parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tiene una estructura similar y/o una función común. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tejido cerebral, retina, tejido de piel, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, cartílago, tejido conjuntivo, tejido sanguíneo, tejido de músculo, tejido cardíaco, tejido cerebral, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal, tejido hematopoyético.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse por procesos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grajeas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

5 Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención pueden así formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

10 Para inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en disoluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, penetrantes apropiados a la barrera que va a atravesarse se usan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

15 Para administración por vía oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Pueden prepararse preparaciones farmacológicas para uso oral usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

30 Se proporcionan núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar con recubrimientos adecuados. Para este fin, pueden usarse disoluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse tintas o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de comprimidos recubiertos de azúcar para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

35 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, además de cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración por vía oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

45 Para administración por vía oral, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

50 Para administración por inhalación nasal, los principios activos para su uso según la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de spray en aerosol de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dispensador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

55 La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de multidosis con opcionalmente un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

60 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los principios activos pueden prepararse como suspensiones para inyección aceitosas o basadas en agua apropiadas. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias, que

aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

5 Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, disolución basada en agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

10 La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

15 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de un trastorno (por ejemplo, cáncer) o prolongar la supervivencia del sujeto que está tratándose.

20 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está perfectamente dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

25 Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para lograr una concentración deseada o título. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

30 La toxicidad y eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en formular un intervalo de dosificación para su uso en el ser humano. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden elegirse por el médico individual en vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1).

35 La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar que los niveles de anticuerpo del principio activo sean suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Dosificaciones necesarias para lograr la CEM dependerán de características individuales y la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para determinar concentraciones plasmáticas.

40 La eficacia terapéutica puede validarse adicionalmente en modelos animales correlativos que son muy conocidos en la técnica. Xenoinjertos humanos en ratones inmunodeficientes. Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección que va a tratarse, la dosificación puede ser de una única administración o una pluralidad de administraciones, con ciclos de tratamiento que duran de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la cura o se logre la disminución del estado de enfermedad.

45 La cantidad de una composición que va a administrarse dependerá, por supuesto, del sujeto que está tratándose, la gravedad de la afección, el modo de administración, el criterio del médico que receta, etc.

50 Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o de plástico, tal como un envase alveolado. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede alojar un aviso asociado al recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, aviso que refleja la autorización por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede ser de etiqueta autorizada por la Agencia Estadounidense del Medicamento para la prescripción fármacos o de un prospecto autorizado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, disponerse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado adicionalmente anteriormente.

60 Aparte de las aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en aplicaciones de diagnóstico.

65 Así, según otro aspecto, se proporciona un método de diagnóstico de un cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método poner en contacto una muestra biológica derivada del sujeto (*in vivo* o *ex vivo*) con

el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento, en el que una formación de complejos más allá de un umbral predeterminado es indicativa del cáncer en el sujeto. Según algunas realizaciones, las células del cáncer se caracterizan por expresión en exceso de CEACAM1 en comparación con células sin afectar.

5 Como se ha mencionado, el método de la invención se efectúa en condiciones suficientes para formar un inmunocomplejo; tales condiciones (por ejemplo, concentraciones apropiadas, tampones, temperaturas, tiempos de reacción), además de métodos para optimizar tales condiciones, son conocidas para aquellos expertos en la materia, y ejemplos se desvelan en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término “inmunocomplejo” se refiere a un complejo que comprende el anticuerpo de la invención y CEACAM1.

10 La determinación de una presencia o nivel del inmunocomplejo de la invención puede ser directa o detectando un resto identificable (detectable) que puede unirse al anticuerpo.

15 El nivel del inmunocomplejo en la célula probada (por ejemplo, una célula de un sujeto en necesidad del mismo) se compara con un umbral predeterminado. Se apreciará que el anticuerpo de la presente invención también puede usarse para medir la cantidad de CEACAM1 soluble en suero. Independientemente, el umbral puede determinarse basándose en un nivel de referencia conocido y/o un nivel en una célula de control o suero. La célula de control puede obtenerse de un control, sujeto sano (por ejemplo, un sujeto que no padece el cáncer) o del mismo sujeto antes del inicio de la enfermedad o tras el tratamiento. Según algunas realizaciones de la invención, el sujeto de control es de la misma especie, por ejemplo, humana, preferentemente que coincide con la misma edad, peso, sexo, etc., que el sujeto en necesidad del mismo.

20 Como se usa en el presente documento, el término “diagnosticar” se refiere a determinar la presencia o ausencia de una patología, clasificar una patología o un síntoma, determinar una gravedad de la patología, monitorizar la progresión de la patología, predecir un desenlace de una patología y/o perspectivas de recuperación.

25 Para facilitar el diagnóstico, las enseñanzas anteriores pueden combinarse con otros métodos de diagnóstico del cáncer que son muy conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, obtención de imágenes, pruebas moleculares y biopsias quirúrgicas.

30 Una vez se establece el diagnóstico, el sujeto se informa del diagnóstico y pueden iniciarse tratamientos adecuados.

35 Los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye, pero no se limitan a”. Este término engloba los términos “que consiste en” y “que consiste esencialmente en”.

40 La expresión “que consiste esencialmente en” significa que la composición o método puede incluir componentes y/o etapas adicionales, pero solo si los componentes y/o etapas adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición o método reivindicado.

45 Como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, que incluyen mezclas de los mismos.

50 En toda la presente solicitud, diversas realizaciones de la presente invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en el formato de intervalo es simplemente por comodidad y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un intervalo debe considerarse que ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos, además de valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debe considerarse que desvela específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., además de números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la anchura del intervalo.

55 Siempre que un intervalo numérico se indique en el presente documento, pretende incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las expresiones “que oscila/oscila entre” un primer número indicado y un segundo número indicado y “que oscila/oscila de” un primer número indicado “a” un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y se indica que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros entremedias.

60 Como se usa en el presente documento, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada que incluye, pero no se limita a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos tanto conocidos para, como fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos por, profesionales de las ciencias químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

65 La palabra “a modo de ejemplo” se usa en el presente documento para significar “que sirve como un ejemplo, caso o

ilustración". Cualquier realización descrita como "a modo de ejemplo" no debe interpretarse necesariamente como preferida o ventajosa con respecto a otras realizaciones y/o excluir la incorporación de características de otras realizaciones.

5 La palabra "opcionalmente" se usa en el presente documento para significar "se proporciona en algunas realizaciones y no se proporciona en otras realizaciones". Cualquier realización particular de la invención puede incluir una pluralidad de "características opcionales", a menos que tales características discrepen.

10 Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también puedan proporcionarse en combinación en una única realización. En cambio, diversas características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como es adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no van a considerarse características esenciales de aquellas realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa sin aquellos elementos.

15 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se han delineado anteriormente en este documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

## 20 EJEMPLOS

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención de un modo no limitante.

25 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de EE.UU. N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se expusieran completamente en el presente documento. Otras referencias generales se proporcionan en todo este documento. Se cree que los procedimientos en el presente documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan por comodidad del lector. Toda la información contenida en ellos se incorpora en el presente documento por referencia.

### 50 EJEMPLO 1

#### **Generación de anticuerpos monoclonales**

#### 55 **Generación de anticuerpos monoclonales MRG1**

Se generó un anticuerpo monoclonal que bloquea eficazmente las interacciones homófilas de CEACAM1 *in vitro* a concentraciones nanomolares. Brevemente, se inmunizaron ratones 3 veces, a intervalos de 2 semanas, con 5 microgramos de CEACAM1 humana recombinante (proteína entera, comercialmente disponible de R&D Systems). Se recogieron los esplenocitos y se fusionaron con células SP2/0, para generar una biblioteca de hibridomas.

El hibridoma que produce el anticuerpo bloqueante de CEACAM1 (MRG1 mAb) se volvió a clonar varias veces para dar un clon estable.

#### 65 **Otros anticuerpos monoclonales**

Se compraron mAb Kat4c y policlonal anti-CEACAM de conejo de DAKO (Glostrup, Dinamarca).

**EJEMPLO 2**

5 **Especificidad del mAb anti-CEACAM1**

**MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

**Generación de células que expresan CEACAM**

10 Se transfectaron establemente 721.221 células humanas CEACAM negativas (linfocitos B parentales) con CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 o CEACAM8 por electroporación y selección con G418.

15 Se transfectaron las células parentales BW de timoma murino (células que carecen de TCR alfa y cadenas beta, todavía retienen la maquinaria de secreción completa de IL-2) con una molécula quimérica que comprende la porción extracelular de CEACAM1 humana fusionada con la transmembrana y cola citosólica de la cadena zeta murina. La transfección se realizó por electroporación y selección con G418.

**Cribado de anticuerpos por FACS**

20 Se cribaron hibridomas para actividad de unión de CEACAM1 por citometría de flujo del siguiente modo:

- (a) Se dispusieron 50.000 células CEACAM transfectadas en 96 pocillos en forma de U.
- (b) Las células se lavaron con tampón de FACS frío (PBS, BSA 0,5 %, azida 0,05 %).
- 25 (c) Las células se incubaron con el mAb de tinción (MRG1 o Kat4c): 0,1 microgramos de mAb por 100 microlitros, durante 30 minutos, sobre hielo.
- (d) Las células se centrifugaron, se eliminaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en 100 microlitros de anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados con FITC (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:200.
- 30 (e) Después de 30 minutos de incubación (sobre hielo en condiciones oscuras), las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en tampón de FACS.
- (f) Las células se analizaron usando un software FACScalibur y CellQuest.

**RESULTADOS**

35 Como las 721.221 células parentales no expresan ninguna de las proteínas CEACAM, estas células se transfectaron establemente con CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 o CEACAM8 con el fin de probar la especificidad de los anticuerpos monoclonales (mAb) para CEACAM1. Los hibridomas se cribaron entonces para actividad de unión de CEACAM1 por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 1A, el mAb MRG1 generado según las presentes enseñanzas es específico para CEACAM1 humana. Tiene una reactividad cruzada insignificativa con CEACAM5 y no se une a CEACAM6 o CEACAM8. La Figura 1B muestra que todos los transfectantes expresaron moléculas CEACAM, siendo CEACAM1 la menor, que enfatiza el patrón específico de MRG1.

40

**EJEMPLO 3**

45 **El mAb es capaz de inhibir la unión homófila de CEACAM1**

**MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

50 **Cribado de anticuerpos por ELISA**

Se probó la actividad de bloqueo de CEACAM1 usando un sistema funcional de BW. El sistema funcional de BW comprende una línea celular de ratón (BW) transfectada establemente con una molécula quimérica que comprende el dominio extracelular de CEACAM1 humana fusionado con la cadena zeta de ratón (BW/CEACAM1-zeta, véase el Ejemplo 2, anteriormente). La co-incubación de las células BW/CEACAM1-zeta con otras células CEACAM1 positivas produjo la secreción de concentraciones medibles de IL-2 de ratón.

Así, BW/CEACAM1-zeta (células efectoras) o 221/CEACAM1 (células diana) se pre-incubaron cada una por separado con 10-40 ng/ml de mAb MRG1. Tras una hora incubación sobre hielo se añadieron las células recíprocas (221/CEACAM1 o BW/CEACAM1) y se midió la secreción de IL-2 de ratón por ELISA de sándwich (R&D Systems).

60

**Ensayo de citotoxicidad**

65 Se realizaron ensayos de citotoxicidad que prueban la destrucción de diversas líneas de melanoma por linfocitos infiltrantes de tumores en presencia o ausencia de 1 µg/ml de mAb MRG1. Se usaron células de melanoma CEACAM1<sup>High</sup> 526mel, 624mel y CEACAM1<sup>dim</sup> 09mel como células diana. Se usaron células TIL014 como células

efectoras a una relación E:T de 10:1. Tras una hora de incubación con el mAb MRG1 sobre hielo, se añadieron las células recíprocas y se co-incubaron durante 5 horas a 37 °C. Las células diana se pre-marcaron con un colorante fluorescente verde (CFSE) y se determinó la lisis específica por co-tinción con yoduro de propidio (PI) en citometría de flujo. Se restó la muerte espontánea.

## RESULTADOS

Se verificó la capacidad del mAb MRG1 purificado para inhibir la unión homófila de CEACAM1. Como se muestra en la Figura 2, el mAb MRG1 purificado mostró una inhibición dependiente de la dosis de la unión homófila de CEACAM1. A una concentración de 10 ng/ml, el mAb redujo eficazmente las interacciones de CEACAM1, alcanzando eficazmente una meseta a una concentración de 20 ng/ml. Y, lo que es más importante, los dos escenarios experimentales, es decir, la adición del mAb MRG1 a las células efectoras, BW/CEACAM1-zeta, o a las células diana, 221/CEACAM1, mostraron resultados similares (la secreción de IL-2 de ratón se bloqueó eficazmente).

El efecto de bloqueo del mAb MRG1 se demostró adicionalmente en ensayos de citotoxicidad. Como se muestra en la Figura 3, la destrucción de las células CEACAM1<sup>high</sup>526mel y 624mel se potenció por la incubación del anticuerpo con células efectoras (pero no sobre células diana). La destrucción de las células CEACAM1<sup>dim</sup>09mel no estuvo afectada por la presencia del mAb MRG1 (Figura 3).

### EJEMPLO 4

#### *El mAb anti-CEACAM1 inhibe la migración y proliferación de células cancerosas*

## MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### *Ensayo de invasión*

Se probó el efecto de bloqueo de los anticuerpos en un ensayo de invasión. Brevemente, se pre-incubaron células de melanoma (08mel o 09mel) en presencia o ausencia de 1 µg/ml de mAb MRG1 y a continuación se trataron por ensayos de invasión en Matrigel. La invasión se dejó durante 24 horas y la cantidad de células invasoras se cuantificó con XTT normalizado.

### *Ensayo de proliferación neta*

Se sembraron células CEACAM1<sup>high</sup> 526mel en el día 0 en placas de 48 pocillos (2.500 células por pocillo). Al sembrar se añadió MRG1 en 3 concentraciones diferentes (0,5, 1 o 3 µg/ml), o no se añadió en absoluto. Se contaron las células viables totales 2 días o 5 días después de la siembra. Se determinó proliferación con XTT normalizado y por recuento de células directo.

## RESULTADOS

Como se muestra en la Figura 4, MRG1 bloqueó la invasión de células 08mel CEACAM1 positivas (el nivel de expresión de CEACAM1 fue medio, es decir, la mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de CEACAM1 fue 50) y tuvo poco o ningún efecto sobre células CEACAM1<sup>dim</sup> 09mel (el nivel de expresión de CEACAM1 fue bajo, es decir, la mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de CEACAM1 fue 15).

También se probó MRG1 en ensayos de proliferación neta. Se observó una inhibición dependiente de la dosis en la proliferación neta de células 526mel (Figura 5). Tras 5 días de tratamiento, la proliferación se redujo más del 60 % (con 3 µg de mAb MRG1).

### EJEMPLO 5

#### *MRG1 inhibe el crecimiento de células de cáncer en modelos experimentales animales*

## MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### *Modelos de xenoinjerto de melanoma*

Se inyectaron subcutáneamente  $5 \times 10^6$  células de melanoma humano CEACAM1<sup>+</sup> al flanco de ratones SCID-NOD de 7 semanas de edad. Se formaron masas tumorales en el 100 % de los ratones en el plazo de 14-17 días y continuaron creciendo. Las dimensiones tumorales se monitorizaron no invasivamente con un compás calibrador 3 veces a la semana y la aproximación del volumen se calculó como (d1 x d2 x d3/2).

La administración de MRG1 se realizó mediante inyección de 0,5 mg de anticuerpo diluido en 0,5 ml de PBS estéril intraperitonealmente. La inyección de PBS sirvió de control.

La administración de linfocitos anti-melanoma humanos reactivos se realizó mediante inyección intravenosa en la vena de la cola de  $20 \times 10^6$  células diluidas en 200  $\mu$ l de PBS estéril.

5 **RESULTADOS**

10 En línea con las funciones de bloqueo demostradas anteriormente, la administración del anticuerpo MRG1 inhibió el crecimiento tumoral. Este efecto fue evidente cuando el anticuerpo se administró en el momento de la inoculación de células tumorales (Figura 6A, "Configuración de prevención") o después de que ya se hubiera formado una masa tumoral medible (Figura 6B, "Configuración de tratamiento"). Estos efectos fueron evidentes después de 4 inyecciones dentro de 8 días, seguido de monitorización no invasiva (véanse las flechas en la Figura 6). Debe observarse que este efecto fue independiente de cualquier efecto inmunomodulador, ya que los ratones SCID-NOD son inmunodeficientes.

15 La simulación de respuesta inmunitaria anti-melanoma se realizó por una única inyección intravenosa de linfocitos anti-melanoma humanos reactivos, que inhibieron el crecimiento tumoral (Figura 7). Este efecto se potenció significativamente por inyecciones intraperitoneales de MRG1 una vez a la semana.

20 **EJEMPLO 6**

***MRG1 es superior a los anticuerpos anti-CEACAM1 previamente descritos***

**MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

25 ***Cribado de anticuerpos por ELISA***

Se probó la actividad de bloqueo de CEACAM1 usando un sistema funcional de BW como se describe en detalle en el Ejemplo 3, anteriormente en este documento.

30 Se pre-incubaron 100.000 células BW/CEACAM1-zeta con 15 ng/ml de mAb MRG1, 2600 ng/ml de mAb Kat4c o 600 ng/ml de anticuerpo policlonal anti-CEACAM de conejo. Tras una hora incubación sobre hielo, se añadieron 50.000 células 721.221/CEACAM1 y se midió la secreción de IL-2 de ratón por ELISA de sándwich (R&D Systems).

35 **RESULTADOS**

Como se representa en el Ejemplo 3, anteriormente en este documento, los inventores demostraron un bloqueo casi completo de la actividad de CEACAM1 usando 15 ng/ml de mAb MRG1. A diferencia, el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 Kat4c fue capaz de dar un menor efecto de bloqueo solo cuando se probaron concentraciones 200 veces mayores y el anticuerpo policlonal anti-CEACAM de conejo dio un efecto inhibitor similar con concentración 40 veces mayor (2600 ng/ml y 600 ng/ml, respectivamente, Figura 8).

40 Aunque la invención se ha descrito conjuntamente con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Por consiguiente, pretende englobar todas aquellas alternativas, modificaciones y variaciones que entran dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

45 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia en la memoria descriptiva, al mismo grado que si cada publicación individual, patente o solicitud de patente se indicara específicamente e individualmente que se incorpora en el presente documento por referencia. Además, la citación o identificación de cualquier referencia en la presente solicitud no debe interpretarse como una admisión de que tal referencia esté disponible como estado de la técnica para la presente invención. Hasta el punto que se usan encabezados de sección, no deben interpretarse como necesariamente limitantes.

55

60

65

**Reivindicaciones**

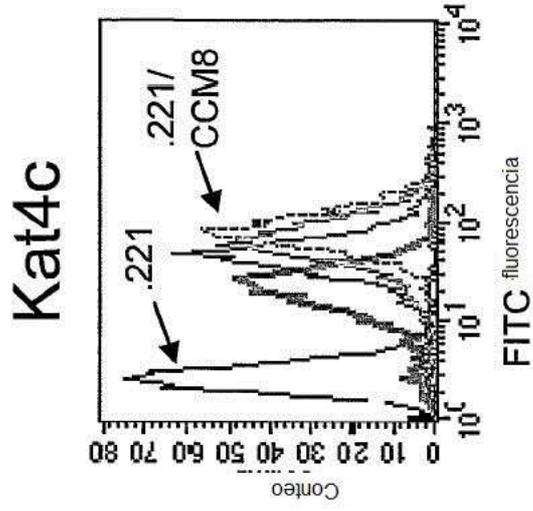
1. Un célula de hibridoma que se ha depositado bajo ATCC Número de acceso PTA-9974.
- 5 2. Un anticuerpo anti-CEACAM1 aislado o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que tiene las secuencias de CDR y orientación del anticuerpo producido a partir de la célula de hibridoma que se ha depositado bajo ATCC Número de acceso PTA-9974.
- 10 3. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es selectivo para CEACAM1.
4. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 3 producido a partir de la célula de hibridoma que se ha depositado bajo ATCC Número de acceso PTA-9974.
- 15 5. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 2 unido a un resto citotóxico.
6. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 5, en el que dicho resto citotóxico comprende una citotoxina, una quimiocina, una quimioterapia, una pro-apoptósica, un interferón, un resto radiactivo, o combinaciones de los mismos.
- 20 7. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 2 unido a un resto identificable.
8. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 2, para tratar cáncer, preferentemente melanoma.
- 25 9. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 2 para la inmunomodulación de una célula tumoral que expresa CEACAM1 por un linfocito que expresa CEACAM1; preferentemente en el que el linfocito que expresa CEACAM1 es un linfocito T citotóxico.
- 30 10. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 2 para inhibir la migración o proliferación de una célula tumoral que expresa CEACAM1, preferentemente en el que dicha célula tumoral comprende una célula tumoral de melanoma.
- 35 11. Un método de diagnóstico de un cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método poner en contacto una muestra biológica derivada del sujeto con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 2 o 5, en el que las células del cáncer se **caracterizan por** la expresión en exceso de CEACAM1 en comparación con células sin afectar y en el que una formación de complejos más allá de un umbral predeterminado es indicativa del cáncer en el sujeto.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho cáncer es melanoma.
13. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 2 para inhibir la interacción proteína-proteína homotípica o heterotípica de CEACAM1 de un linfocito que expresa CEACAM1.
- 45 14. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 13, en el que dicho linfocito que expresa CEACAM1 es un linfocito infiltrante de tumores o célula NK; o en el que dicho linfocito que expresa CEACAM1 es un linfocito T citotóxico.
- 50 15. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 2 o 5.

55

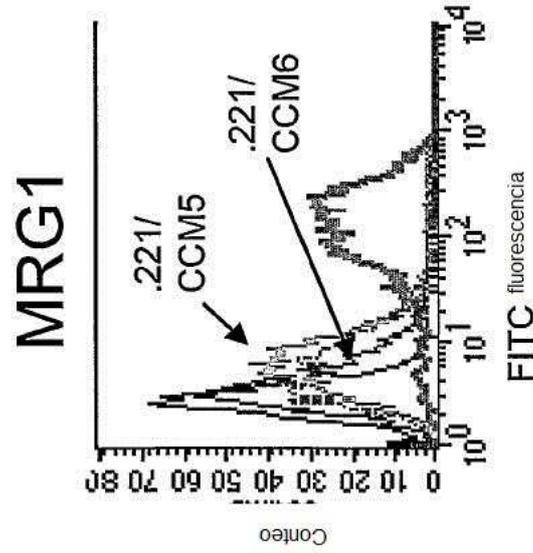
60

65

**FIG. 1B**



**FIG. 1A**



**FIG. 2**

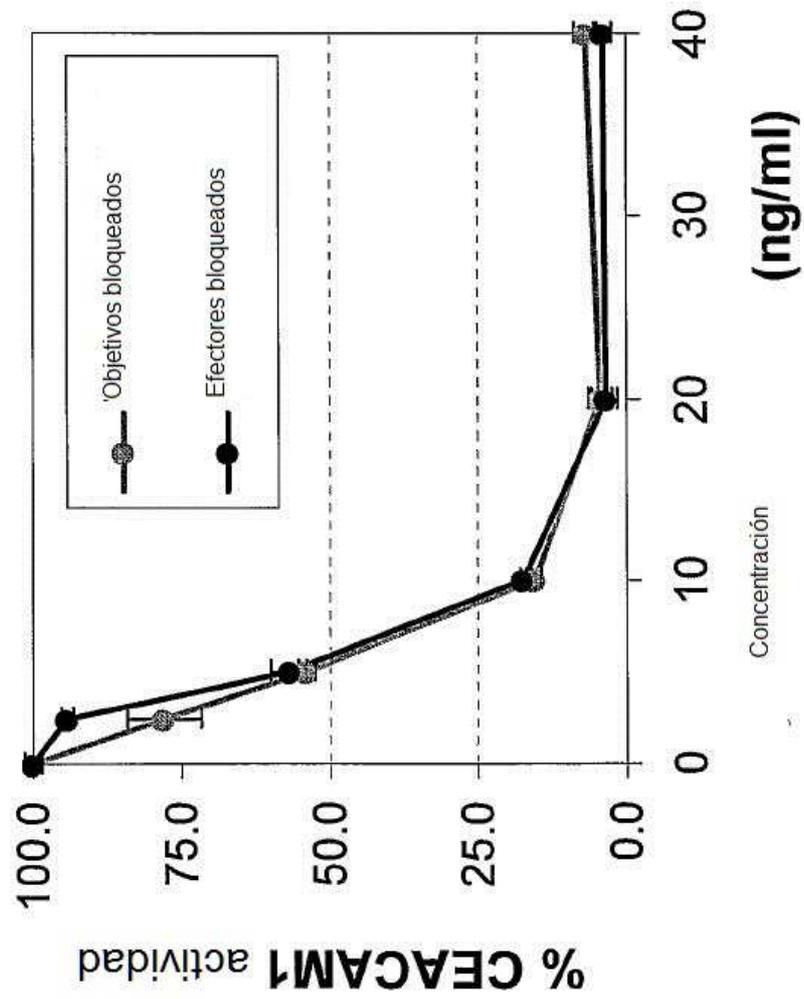
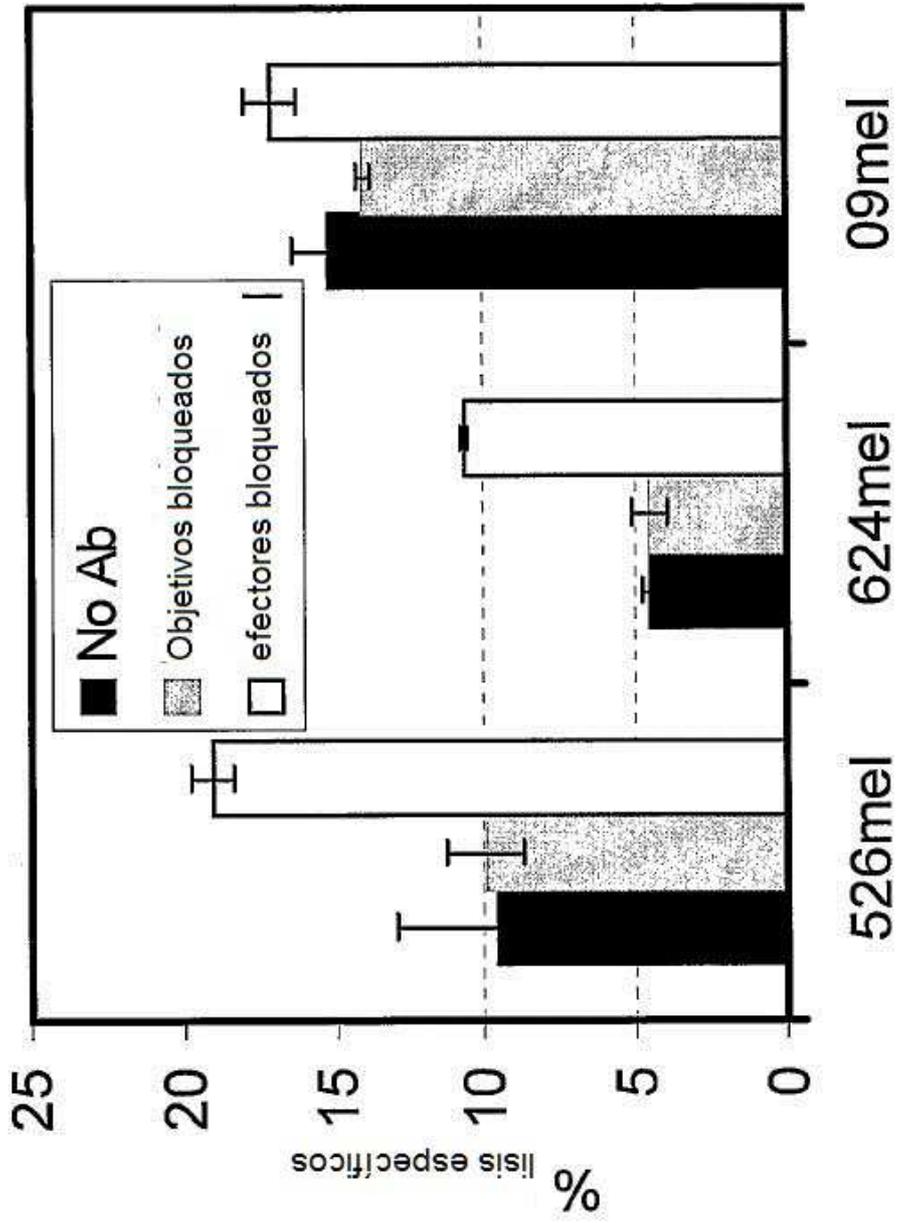
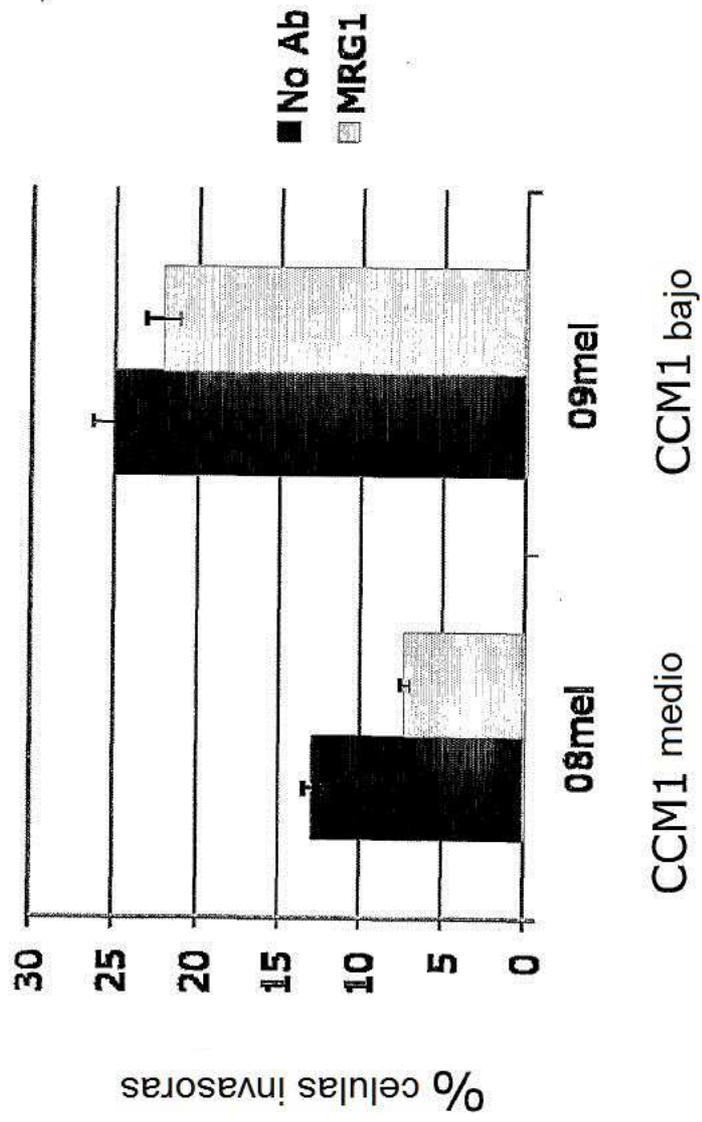


FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5**

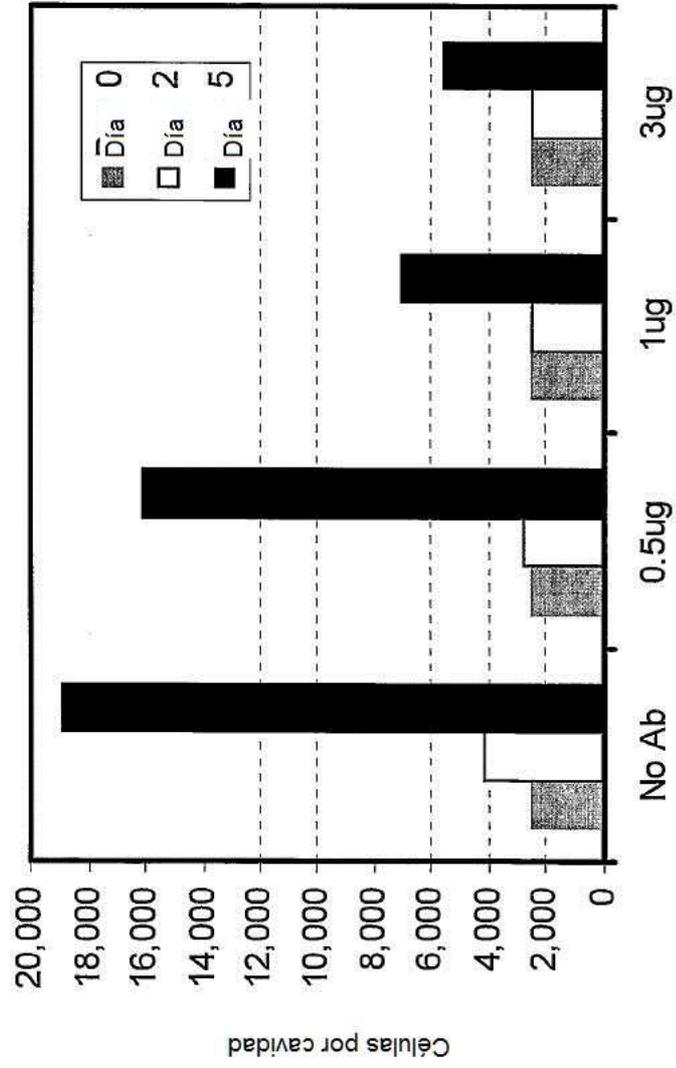


FIG. 6A

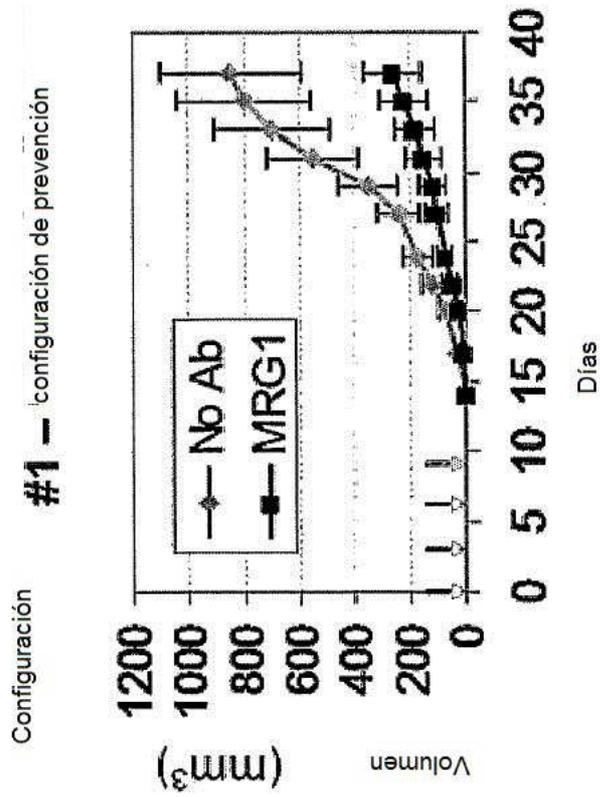


FIG. 6B

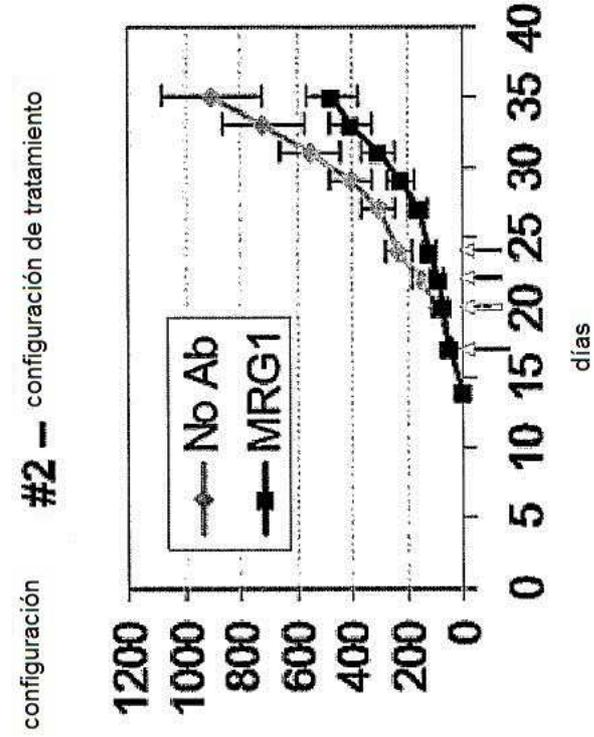
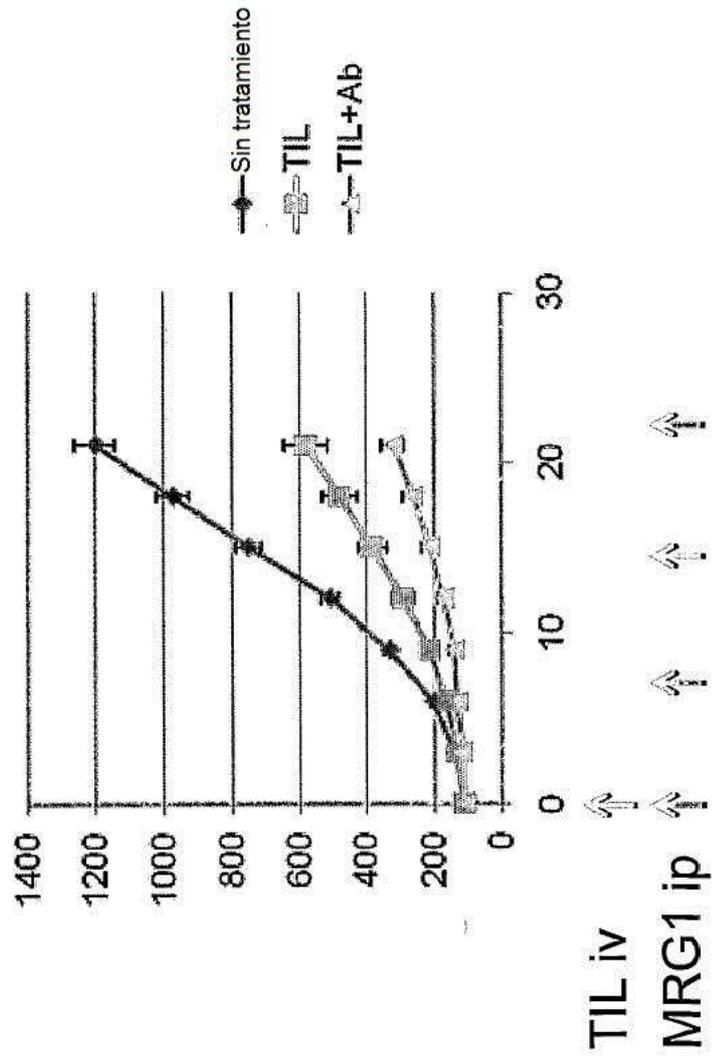


FIG. 7



**FIG. 8**

