

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 488**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01)
C07K 16/42	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2012 PCT/IL2012/050402**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13054331**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 12840002 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2744829**

54 Título: **Anticuerpos para molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario (CEACAM)**

30 Prioridad:
11.10.2011 WO PCT/IL2011/000808

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

73 Titular/es:
**TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH
INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD. (33.3%)
The Chaim Sheba Medical Center Tel HaShomer
52 621 Ramat Gan, IL;
CCAM BIOTHERAPEUTICS LTD. (33.3%) y
RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:
**MARKEL, GAL;
BEN MOSHE, TEHILA;
SAPIR, YAIR;
MANDEL, ILANA;
SCHACHTER, JACOB y
ORTENBERG, RONA**

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 661 488 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 para molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario (CEACAM)**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico, útiles en enfermedades que implican molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario (CEACAM), expresión, activación o función. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos que tienen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) específicas y propiedades mejoradas frente a otros anticuerpos que reconocen CEACAM1.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La proteína de transmembrana molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1 (CEACAM1, también conocida como glicoproteína biliar (BGP), CD66a y C-CAM1), es un miembro de la familia de antígeno carcinoembrionario (CEA), que también pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina. CEACAM1 interactúa con otras proteínas de CEACAM conocidas, incluidas las proteínas CD66a (CEACAM1), CD66e (CEACAM6) y CD66e (CEACAM5, CEA). Se expresa en un amplio espectro de células, que van desde células epiteliales a las de origen hematopoyético (p. ej., células inmunitarias).

[0003] Se han atribuido muchas funciones diferentes a la proteína CEACAM1. Se demostró que la proteína CEACAM1 está sobreexpresada en algunos carcinomas de colon, próstata y otros tipos de cáncer. Datos adicionales apoyan la participación central de CEACAM1 en angiogénesis y metástasis. CEACAM1 también juega un papel en la modulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Por ejemplo, se demostró que CEACAM1 es un receptor inhibitorio para células T activadas contenidas dentro del epitelio intestinal humano (WO99/52552 y Morales et al., J. Immunol., 1999, 163, 1363-1370). Informes adicionales han indicado que el compromiso de CEACAM1 por reticulación del receptor de células T con anticuerpos monoclonales (mAbs) o por las proteínas Opa de *Neisseria gonorrhoeae* inhibe la activación y proliferación de las células T.

[0004] El melanoma es una malignidad de células productoras de pigmento (melanocitos), responsable del 75% de la mortalidad relacionada con el cáncer de piel en todo el mundo, principalmente debido a una metástasis extensa. El melanoma metastásico (MM) responde débilmente a la mayoría de los regímenes contra el cáncer, y la media de supervivencia general para los pacientes con MM es de 8,5 meses. Existe evidencia de que la sobreexpresión de CEACAM1 puede correlacionarse con un mal pronóstico y se detecta en la mayoría de los casos de melanoma metastásico. CEACAM1 rara vez se expresa mediante melanocitos normales, pero se encuentra con frecuencia en las células de melanoma. La expresión de CEACAM1 en lesiones de melanoma cutáneo primario predice fuertemente el desarrollo de enfermedad metastásica con mal pronóstico. Además, se observó una expresión aumentada de CEACAM1 en células NK derivadas de algunos pacientes con melanoma metastásico en comparación con donantes sanos.

[0005] La evidencia indica que CEACAM1 puede tener un papel importante en infecciones de virus. Por ejemplo, Markel et al. (J. Clinical Investigation 2002, 110, 943-953) demostraron que los linfocitos aislados de las poblaciones de pacientes infectados con CMV expresan la proteína CEACAM1 en niveles aumentados. El aumento de la expresión de CEACAM1 en los linfocitos deciduals podría disminuir la respuesta inmune local y servir como otro mecanismo desarrollado por el virus para evitar el reconocimiento y el aclaramiento principalmente por linfocitos deciduals activados. Albarran-Somoza et al. (Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2006, 54, 1393), que estudiaron el patrón de expresión proteica de CEACAM1 en cáncer de cuello uterino y lesiones precursoras en el contexto de infección por virus del papiloma humano (HPV), mostraron que la inmunotinción CEACAM1 aumenta significativamente en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (SIL) en comparación con SIL de bajo grado y tejidos cervicales normales. Los autores sugirieron que la regulación positiva de CEACAM1 puede estar relacionada con la integración del ADN del VPH en SIL de alto grado y que CEACAM1 puede ser un marcador biológico importante en el SIL y la progresión del cáncer de cuello uterino. En conjunto, esta evidencia indica que CEACAM1 juega un papel importante en diversas infecciones virales. Además, la sobreexpresión de CEACAM1 puede servir como marcador de diversas infecciones virales.

[0006] El documento WO2007/063424 y la solicitud de patente de Estados Unidos N° 20070110668 describen métodos para regular el sistema inmune, y en particular métodos para la regulación de una respuesta inmune específica, que incluyen la regulación de la actividad de linfocitos. Estos métodos comprenden tanto la modulación negativa como la positiva de la función de la proteína CEACAM1.

[0007] La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20070071758 enseña métodos y composiciones para potenciar la eficacia de la terapia con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en el tratamiento del cáncer modulando negativamente la actividad de la proteína CEACAM1, tal como por ejemplo, usando una inmunoglobulina específica para CEACAM1.

5 [0008] La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20080108140 da a conocer procedimientos de modulación de respuestas inmunitarias específicas para crear una inmunidad protectora en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades que requieren el trasplante de tejido. En particular, se refiere a la supresión de respuestas inmunes de una manera dirigida, aumentando la concentración funcional de la proteína CEACAM1 en el tejido diana.

10 [0009] La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040047858 da a conocer anticuerpos específicos que son capaces de modular la actividad de las células T a través de CEACAM1 y usos de los mismos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la respuesta inmune (por ejemplo, injerto contra enfermedad huésped, enfermedades autoinmunes, cánceres, etc.).

15 [0010] La Solicitud de Patente de Estados Unidos N^{os}. 20020028203, 20050169922 y 20080102071 describen composiciones que se unen moléculas de receptores inhibitorios de células T y modulan (es decir, potencian o suprimen) la actividad de células T (por ejemplo, la citotoxicidad y proliferación), tales como agentes de unión a glicoproteína biliar, y métodos para usar tales composiciones tales como para el tratamiento de enfermedades (por ejemplo, una enfermedad autoinmune, inmunodeficiencia, cáncer, etc.).

20 [0011] El documento WO 2010/125571 para el presente inventor describe un anticuerpo monoclonal murino producido por una célula de hibridoma específica. El mAb es altamente selectivo para CEACAM1 y no reacciona de forma cruzada con otros miembros de la familia CEACAM.

25 [0012] Ninguno de los anticuerpos conocidos que reconocen CEACAM1 tiene el espectro de especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de proporcionar anticuerpos que reconozcan subconjuntos específicos de proteínas CEACAM que pueden usarse de forma diagnóstica y terapéutica en enfermedades que implican la expresión o activación de CEACAM.

RESUMEN DE LA INVENCION

30 [0013] La presente invención describe anticuerpos monoclonales que reconocen un conjunto específico de subtipos CEACAM. Ventajosamente, los anticuerpos de la invención muestran unión a CEACAM1 y al menos un subtipo adicional seleccionado de CEACAM5 y CEACAM3. Los anticuerpos de la invención se caracterizan por tener combinaciones únicas de secuencia y estructura de CDR y por unión a epítomos recientemente identificados dentro de la molécula de CEACAM1. La especificidad única de los anticuerpos monoclonales de la presente invención amplía su utilidad terapéutica para el tratamiento y diagnóstico de tipos adicionales de tumores malignos e infecciones víricas. La presente invención también proporciona métodos para identificar y aislar dichos anticuerpos, métodos para su producción, y usos terapéuticos y de diagnóstico de los mismos.

40 [0014] Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención tienen combinaciones específicas de CDR y poseen propiedades únicas y especificidad mejorada y potencia sobre los anticuerpos anti-CEACAM1 conocidos.

45 [0015] De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que reconoce CEACAM1 humano, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que tiene CDR de cadena pesada que comprende la cadena pesada de CDR1 que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NOs: 7 o 13, una CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NOs: 8 o 14, una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NOs: 9 o 15, y CDRs de cadena ligera que comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NOs: 10 o 16, una CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NOs: 11 o 17, y una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NOs: 12 o 18, como también se detalla en la reivindicación 1.

50 [0016] De acuerdo con algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal comprende las CDR de cadena pesada que tiene las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 7, 8 y 9.

55 [0017] De acuerdo con algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal comprende las CDR de cadena pesada que tiene las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 13, 14 y 15.

[0018] De acuerdo con algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal comprende las CDR de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NOs: 10, 11 y 12.

60 [0019] De acuerdo con algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal comprende las CDR de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NOs: 16, 17 y 18.

65 [0020] Según otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal tiene las secuencias de CDR mostradas en los SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17, y 18.

[0021] De acuerdo con todavía otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal tiene las secuencias de CDR

mostradas en los SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11, y 12.

5 **[0022]** De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 26: QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNNLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSG DTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARGDYGGFAVDYWG QGTSVTVSS, o un análogo del mismo que tiene al menos 97% de identidad de secuencia con la secuencia de dominio variable de cadena pesada.

10 **[0023]** De acuerdo con otra realización, el anticuerpo comprende una secuencia de cadena ligera variable de dominio que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 28: DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKSLPRTFGGGTKLEIK, o un análogo de la misma que tiene al menos 97% de identidad de secuencia con la secuencia de dominio de variable de cadena ligera.

15 **[0024]** De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo o fragmento de la misma comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 26 y un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 28, o un un análogo de la misma que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con el anticuerpo o secuencia de fragmento.

20 **[0025]** La presente invención abarca anticuerpos monoclonales aislados de células de hibridoma u otros sistemas biológicos, así como anticuerpos monoclonales producidos de forma recombinante o sintéticamente. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención puede contener una región constante de cualquier especie de mamífero, que incluye pero no se limita a ratón, rata y ser humano. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención incluye un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo xenogénico y un fragmento de anticuerpo que comprende al menos la parte de unión a antígeno de un anticuerpo. El fragmento de anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fd', Fv, dAb, región CDR aislada, anticuerpo monocatenario, "diacuerpos" y "anticuerpos lineales".

30 **[0026]** Según algunas realizaciones particulares, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de anticuerpo que comprende:

i. una secuencia de marco seleccionada del grupo que consiste en: IgG2a de ratón, IgG2b de ratón, IgG3 de ratón, IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana; y
 35 ii. un conjunto de seis CDR que tienen secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17 y 18; o un conjunto de seis CDR que tienen secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11 y 12; y análogos de los mismos que tienen al menos un 97% de identidad de secuencia con dichas secuencias de CDR, en donde el anticuerpo o fragmento monoclonal se une con una afinidad de al menos aproximadamente $5 \times 10^{-7} M$ a al menos dos subtipos de CEACAM.

40 **[0027]** El anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico.

[0028] Tal anticuerpo quimérico puede comprender regiones constantes derivadas de humanos.

45 **[0029]** Las regiones constantes humanas de dicho anticuerpo quimérico se pueden seleccionar del grupo que consiste en: IgG1 humana, IgG2 humana e IgG3 humana. También se describe un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado que reconoce CEACAM1.

[0030] Según otra realización particular, se proporciona un anticuerpo monoclonal quimérico o un fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 30.

50 **[0031]** De acuerdo con todavía otra forma de realización particular, se proporciona un anticuerpo monoclonal quimérico o un fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 31.

55 **[0032]** De acuerdo con todavía otra forma de realización particular, se proporciona un anticuerpo quimérico monoclonal o un fragmento que tiene una secuencia de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 30, y la secuencia de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 31.

60 **[0033]** De acuerdo con una realización particular, se proporciona un anticuerpo monoclonal que reconoce CEACAM1 producido a partir de secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera contenidas en un plásmido depositado el 28 de septiembre de 2011 bajo número de acceso ATCC PTA-12130.

65 **[0034]** Los anticuerpos monoclonales de la presente invención exhiben la unión a más de un subtipo CEACAM específico. El anticuerpo monoclonal se une preferiblemente al menos a dos subtipos diferentes de CEACAM. El anticuerpo monoclonal se une preferiblemente a CEACAM1 y al menos a uno de CEACAM3 y CEACAM5. El anticuerpo monoclonal se une preferiblemente a CEACAM1 y CEACAM5, o a CEACAM1 y CEACAM3. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención se une preferiblemente a los subtipos CEACAM 1, 3 y

5.

[0035] Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención preferiblemente no se une a CEACAM4 y CEACAM6.

5 **[0036]** De acuerdo con algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es reactivo con un epítipo dentro de los residuos 17-29 y 68-79 de CEACAM1 humano que tiene las secuencias VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO: 32) y YPNASLLIQNVT (SEQ ID NO: 33) respectivamente.

10 **[0037]** De acuerdo con algunas realizaciones, el epítipo en la molécula CEACAM1 a la que el anticuerpo monoclonal se une es un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos dentro de las secuencias VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO: 32) y YPNASLLIQNVT (SEQ ID NO: 33).

15 **[0038]** Según otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención se une un epítipo que comprende al menos cuatro aminoácidos de la secuencia de VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO: 32).

[0039] De acuerdo con todavía otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención se une a un epítipo dentro de las secuencias VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO: 32) y PNASLLI (SEQ ID NO: 34).

20 **[0040]** También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención, que tienen afinidad y especificidad por CEACAM1.

[0041] De acuerdo con este aspecto, se da a conocer un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención.

25 **[0042]** La secuencia de polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de ADN expuesta en la SEQ ID NO: 25 o análogo de la misma que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con dicha secuencia de ADN. La secuencia de polinucleótidos aislada puede comprender una secuencia de ADN expuesta en la SEQ ID NO: 27 o un análogo de la misma que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con dicha secuencia de ADN.

30 **[0043]** También se describen los plásmidos que comprenden al menos una secuencia de polinucleótido de acuerdo con la invención, así como células huésped que comprenden estos plásmidos.

35 **[0044]** De acuerdo con una realización particular, se da a conocer un plásmido que comprende secuencias de polinucleótidos establecidas en SEQ ID NOs: 25 y 27, depositadas el 28 de septiembre de 2011 bajo número de acceso ATCC PTA-12130.

40 **[0045]** En otro aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica útil para prevenir, atenuar o tratar una enfermedad o trastorno asociado con expresión, activación o función de CEACAM1, CEACAM3 o CEACAM5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la presente invención; y un transportador farmacéuticamente aceptable.

45 **[0046]** De acuerdo con ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno asociado con la expresión, activación o función de CEACAM1, CEACAM3 y/o CEACAM5 es una enfermedad o trastorno proliferativo celular. De acuerdo con algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno proliferativo celular es cáncer.

50 **[0047]** De acuerdo con algunas realizaciones, se selecciona el cáncer asociado con sobreexpresión de CEACAM5 del grupo que consiste en: cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM) de páncreas gastrointestinal, colorrectal (CRC) de, mama, tiroides, estómago, ovario y uterino.

[0048] De acuerdo con una realización específica los cánceres asociados con la sobreexpresión de CEACAM1 son melanoma, cáncer pancreático, todos los tipos de cánceres de pulmón y mieloma.

55 **[0049]** La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se pueden administrar como un tratamiento independiente o en adición a un tratamiento con cualquier otro agente terapéutico. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un sujeto que lo necesite como parte de un régimen de tratamiento junto con al menos un agente anticancerígeno. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar junto con el otro agente o por separado.

60 **[0050]** En otro aspecto la presente invención proporciona composiciones de diagnóstico útiles para la detección de al menos un subtipo CEACAM seleccionado del grupo que consiste de: CEACAM1, CEACAM3 y CEACAM5, en un sujeto. Una composición de diagnóstico de acuerdo con la invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la presente invención.
65 de la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para prevenir, atenuar o tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, activación o función de CEACAM 1.

[0051] De acuerdo con algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es una enfermedad proliferativa celular o trastorno. De acuerdo con ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno proliferativo celular es cáncer.

de la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar además en inmunomodulación, inhibir la migración de una célula tumoral que expresa CEACAM, inhibir la interacción CEACAM homotípica o heterotípica proteína-proteína, o aumentar la duración o progresión de la respuesta o supervivencia de un sujeto que tiene cáncer.

[0052] Aparte de aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar en aplicaciones de diagnóstico.

[0053] Así, de acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona un método para diagnosticar un cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, el método comprende poner en contacto una muestra biológica derivada del sujeto (in vivo, in vitro o ex vivo) con una composición de diagnóstico que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en la presente memoria, en el que una formación de complejo más allá de un umbral predeterminado es indicativa del cáncer en el sujeto. Las células del cáncer se pueden caracterizar por sobreexpresión de CEACAM en comparación con células no afectadas.

[0054] El cáncer diagnosticado puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en: melanoma, cáncer pancreático, cáncer de pulmón y mieloma.

[0055] La proteína de medida puede ser CEACAM5 y el cáncer diagnosticado puede ser seleccionado del grupo que consiste en: gastrointestinal, cáncer de pulmón de células de páncreas no pequeñas (CPNM) colorrectales (CRC), mama, tiroides, estómago, ovario y uterino.

[0056] Como se ha mencionado, el método descrito anteriormente puede ser afectado en condiciones suficientes para formar un complejo inmuno; tales condiciones (por ejemplo, concentraciones apropiadas, tampones, temperaturas, tiempos de reacción) así como métodos para optimizar tales condiciones son conocidas por los expertos en la técnica, y se describen aquí ejemplos. Como se usa en este documento, la frase "inmunocomplejo" se refiere a un complejo que comprende el anticuerpo de la invención y el CEACAM. La determinación de una presencia o nivel del inmunocomplejo puede ser directa o mediante la detección de un resto identificable (detectable) que puede unirse al anticuerpo.

[0057] El nivel del inmunocomplejo en la célula ensayada (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 CEACAM soluble en suero. Independientemente, el umbral se puede determinar basándose en un nivel de referencia conocido y/o un nivel en una célula o suero de control. La célula de control se puede obtener a partir de un sujeto saludable de control (por ejemplo, un sujeto que no padece el cáncer) o del mismo sujeto antes del inicio de la enfermedad o después del tratamiento. El sujeto de control puede ser de la misma especie, por ejemplo, ser humano, preferiblemente emparejado con la misma edad, peso, sexo, etc., que el sujeto necesitado.

[0058] Para facilitar el diagnóstico, las enseñanzas anteriores se pueden combinar con otros métodos de diagnóstico de cáncer que son bien conocidos en la técnica incluyen pero no se limitan a las imágenes, las pruebas moleculares y las biopsias quirúrgicas.

[0059] También se describe, pero sin formar parte de la presente invención, un método para detectar o cuantificar la presencia de CEACAM. Por lo tanto, también se describen métodos para diagnosticar afecciones asociadas con la expresión de CEACAM usando anticuerpos que reconocen CEACAM. Los métodos de diagnóstico se pueden realizar según realizaciones específicas, *in vitro* o *ex vivo*. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también se pueden usar para configurar métodos de selección. Por ejemplo, se puede construir un ensayo ELISA para medir niveles de polipéptido secretados o asociados a células usando anticuerpos monoclonales y policlonales mediante métodos estándar conocidos en la técnica.

[0060] Se da a conocer un método para detectar o cuantificar la presencia de CEACAM, que comprende las etapas de:

- i. incubar una muestra biológica con un anticuerpo para CEACAM o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos una porción de unión a antígeno;
- ii. detectar el CEACAM unido usando una sonda detectable;
- iii. comparar la cantidad de (ii) con una curva estándar obtenida a partir de muestras de referencia que contienen cantidades conocidas de CEACAM; y
- iv. calcular la cantidad de CEACAM en la muestra de la curva estándar.

[0061] De acuerdo con otra realización, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión CEACAM que comprende las etapas de:

- i. incubar una muestra biológica con el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención;
- ii. detectar el CEACAM unido usando una sonda detectable;
- iii. comparar la cantidad de (ii) con una curva estándar obtenida a partir de muestras de referencia que contienen cantidades conocidas de CEACAM;
- iv. calcular la cantidad de CEACAM en la muestra biológica a partir de la curva estándar; y
- v. comparar la cantidad de (iv) a una cantidad normal de CEACAM.

[0062] La muestra biológica puede ser un fluido corporal de un sujeto mamífero. El sujeto mamífero puede ser humano.

[0063] Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en ensayos de cribado para evaluar niveles de CEACAM en pacientes y para la predicción de la efectividad del tratamiento. Los ensayos de cribado con los anticuerpos de la presente invención pueden permitir la determinación de los niveles de CEACAM y, por lo tanto, la predicción del resultado del tratamiento y la planificación de un régimen de tratamiento apropiado.

[0064] Se puede evaluar el nivel de al menos uno de CEACAM 1, CEACAM3 y CEACAM5.

[0065] El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a un resto identificable.

[0066] Se apreciará que dicha unión de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, y una fracción identificable puede ser efectuada utilizando conjugación química o mediante tecnología de ADN recombinante de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

[0067] El resto identificable puede ser un miembro de un par de unión, que es identificable a través de su interacción con un miembro adicional del par de unión y un marcador 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 etiqueta es una proteína fluorescente o una enzima que produce una reacción colorimétrica.

[0068] Todos los aspectos y realizaciones de la presente invención se presentan en el conjunto adjunto de reivindicaciones. Esencialmente todos los usos conocidos o previstos en la técnica anterior para los anticuerpos CEACAM1, CEACAM3 y CEACAM5 pueden estar acompañados con los anticuerpos de la presente invención que se ha demostrado que posee una afinidad mejorada hacia estas proteínas y efectos inmunomoduladores inhibitorios superiores e indirectos sobre las células portadoras de CEACAM1. Estos usos incluyen técnicas diagnósticas, profilácticas y terapéuticas.

[0069] Otras formas de realización y el alcance completo de aplicabilidad de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada dada a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0070]

La **Figura 1** es una imagen de SDS-PAGE que muestra cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo químico CM10.

La **Figura 2** muestra la curva de unión específica de CM10 a hCEACAM1 purificado.

La **Figura 3** demuestra la unión específica de CM10 a CEACAM1 detectada por análisis de citometría de flujo.

La **Figura 4** confirma que CM10 bloquea la interacción CEACAM1-CEACAM1 entre las células. Se midió mediante ELISA la secreción de IL-2 de ratón de células efectoras (células BW/221 que expresan CEACAM1) incubadas en presencia de diversas concentraciones de CM10.

La **Figura 5** muestra la mejora de CM10 de la actividad específica de muerte de las células de melanoma positivas para CEACAM1.

La **Figura 6** demuestra que CM10 estimula la actividad asesina de los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL).

La **Figura 7** demuestra que CM10 potencia la actividad de muerte de células NK en líneas celulares de melanoma positivas para CEACAM1.

La **Figura 8** El efecto inmunomodulador CM10 inhibe el crecimiento tumoral in vivo. Las flechas indican el tiempo de administración (círculos CM10, triángulos TIL, cuadrados abiertos CM10 y TIL).

La **Figura 9** es una presentación esquemática del modo de acción inmunomodulador CM10.

La **Figura 10** representa el nivel de intensidad de unión a CEACAM1 en tumores como se determina por el anticuerpo anti CEACAM1.

La **Figura 11** muestra la cuantificación de moléculas de CM10 unidas por célula.

La **Figura 12** confirma que CM10 no tiene ningún efecto sobre la proliferación de PBMC. Los resultados representan las tasas promedias de proliferación de tres donantes por cada tratamiento.

La **Figura 13** presenta el análisis de FACS de la unión entre CM10 a las proteínas de la familia CEACAM. CEACAM1, 5, 6 y 8 fueron expresados por 721.221 células, y CEACAM3 y 4 por células HEK293T.

La **Figura 14** representa los resultados del ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en líneas celulares de melanoma.

La **Figura 15** demuestra que CM10 potencia la secreción de granzima B de TIL en presencia de células de melanoma positivas para CEACAM1 y HLA-A2.

La **Figura 16** muestra que CM10 bloquea las interacciones CEACAM1-CEACAM5.

La **Figura 17** presenta una mejora de CM10 de la destrucción de células T restringidas por HLA.

La **Figura 18** demuestra que la actividad inmunomoduladora de CM10 inhibe el crecimiento tumoral in vivo.

La **Figura 19**: indica que CM10 potencia la actividad asesina de las células NK en las líneas celulares COLO-357 y BXPC3 de cáncer de páncreas positivas para CEACAM1.

La **Figura 20**: demuestra que CM10 potencia la secreción de granzima B de células NK en presencia de líneas celulares de cáncer de páncreas positivas para CEACAM1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0071] La presente invención proporciona anticuerpos que reconocen CEACAM1 que comprende conjuntos específicos de secuencias de CDR que poseen especificidad, selectividad, afinidad y/o actividad mejorada y única.

[0072] Los anticuerpos según la presente invención se unen CEACAM1 con mayor afinidad que otros anticuerpos anti-CEACAM1, que bloquean la función de CEACAM1, mientras que no todos los anticuerpos anti CEACAM lo hacen, y más eficientemente que los anticuerpos anti CEACAM policlonales. Además, los anticuerpos según la presente invención son eficaces contra células cancerosas, en particular células de melanoma: los anticuerpos hacen que las células de melanoma sean más susceptibles a linfocitos, inhiben la tasa de crecimiento de melanoma in vivo, un efecto que se potencia cuando el anticuerpo se combina con transferencia de células T adoptivas in vivo.

[0073] Se muestra aquí por primera vez que el efecto anti-melanoma in vivo de anticuerpos anti-CEACAM1 de acuerdo con la invención es un efecto anti-tumoral directo combinado, así como efecto inmunomodulador que representa a las células más susceptibles a los linfocitos reactivos.

[0074] Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, fragmentos y derivados se pueden utilizar como una herramienta eficaz para el diagnóstico, la inmunomodulación y tratamiento del cáncer.

[0075] El anticuerpo inhibe interacciones homofílicas de CEACAM1, según lo determinado por la co-incubación de las células efectoras inmunes y células diana que expresan CEACAM1 y ensayan la secreción de IL-2 y por los ensayos asesinos in vitro.

[0076] El anticuerpo de la presente invención se muestra para potenciar CM10 potencia destrucción de células T restringidas por HLA y potencia la secreción de granzima B (una proteasa de serina implicada en la apoptosis de mediación de las células diana) de las células NK y T efectoras en presencia de células diana específicas, permitiendo así la destrucción mejorada observada de las células diana por el anticuerpo. También inhibe la unión entre CEACAM1 y CEACAM5 de una manera dependiente de la dosis, por lo tanto puede usarse para tratar tumores malignos que expresan un alto nivel de CEACAM5 y explotar el eje CEACAM1-CEACAM5 para suprimir las células inmunes.

[0077] Además, se muestra en este documento que un anticuerpo de acuerdo con la invención es eficaz en la inhibición de invasión de células de melanoma. Además, la administración *in vivo* de un anticuerpo de acuerdo con la invención, solo o en combinación con linfocitos reactivos se mostró eficaz para inhibir el crecimiento de tumores de melanoma. La combinación de la transferencia de células T adoptivas humanas con inyecciones de anticuerpos monoclonales exhibió sinergismo significativo e inhibió fuertemente el crecimiento de xenoinjertos en comparación con el grupo de control de isotipo.

[0078] De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado que tiene la misma especificidad de unión y la selectividad a un anticuerpo definido en este documento que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que tiene segmentos CDR específicos descritos anteriormente. De acuerdo con este aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado es capaz de unirse al mismo determinante del epítipo de la proteína CEACAM1 como lo hace el anticuerpo descrito anteriormente por sus secuencias específicas de segmentos de CDR.

[0079] La secuencia propuesta de un epítipo al que un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención se une se da a conocer en el presente documento para el mismo tiempo, junto con péptidos aislados propuestos derivados de este epítipo que se puede utilizar para generar anticuerpos monoclonales adicionales.

[0080] Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden ser diseñados para atacar selectivamente a las células tumorales y provocar una variedad de respuestas una vez consolidadas. Estos agentes pueden destruir células tumorales de diferentes maneras, como bloquear la proliferación de células tumorales o activar el sistema inmune. Los anticuerpos monoclonales quiméricos de acuerdo con la presente invención se diseñaron para unirse específicamente y neutralizar diversas funciones de la proteína CEACAM1 y otras proteínas del subtipo CEACAM, y para inducir la muerte específica de células tumorales. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se sugiere que los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención actúen también a través de la activación del

sistema inmune contra células cancerosas.

[0081] Tanto la evidencia clínica como la biológica destaca CEACAM1 como un objetivo prometedor para el desarrollo de la inmunoterapia específica. CEACAM1 no se encuentra en los melanocitos normales, pero se somete a neoexpresión y se expresa ampliamente en la gran mayoría de las muestras de melanoma metastásico. Se ha demostrado previamente de forma mecánica que CEACAM1 protege las células de melanoma al inhibir las funciones efectoras de las células NK y las células T.

[0082] Se demostró en el presente documento por primera vez que CM10 es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une con alta afinidad a CEACAM1 humano. *In vitro*, CM10 bloqueó eficazmente las interacciones CEACAM1-homófilas de una manera dependiente de la dosis y mejora la eliminación de las células de melanoma positivas para CEACAM1 por las células T y las células NK. Además, CM10 inhibió significativamente el crecimiento *in vivo* de xenoinjertos de melanoma cuando se administra de manera sistémica junto con linfocitos T humanos reactivos con melanoma (linfocitos infiltrantes de tumor, TIL). Sin querer estar ligado a ninguna teoría, esto está en línea con el mecanismo de acción sugerido; abrogación de las interacciones inmunoprotectoras de las células tumorales con los linfocitos activados.

[0083] Varias evidencias informaron que CEACAM1 se expresa por una amplia variedad de células epiteliales, como de colon, próstata, mama, riñón etc. Se ha realizado el examen extensivo de perfil de expresión CEACAM1 en tejidos normales y malignos por IHC. El análisis de expresión mostró una fuerte tinción de células de melanoma, en comparación con la ausencia de tinción de la gran mayoría de los tejidos probados en un tejido humano normal. Sin embargo, se observó cierta tinción selectiva en sitios restringidos de varios órganos. Cuando se utilizó más método cuantitativo para cuantificar el número de moléculas de mAb CM10 unidas a células primarias malignas y normales, se pudieron detectar moléculas de CM10 muy bajas en células normales, lo que puede indicar que CM10 se une principalmente a las células tumorales del paciente. Además, se muestra que CM10 no tiene ningún efecto sobre la proliferación de células primarias y es completa o casi completamente, incapaz de inducir CDC o ADCC que indiquen la seguridad potencial del anticuerpo monoclonal en sujetos humanos.

[0084] Ya que CM10 tiene una actividad de inmunomodulación, los posibles efectos secundarios relacionados con el sistema inmune, son evaluados. Después de la activación de PBMC, CEACAM1 está regulado positivamente sobre los linfocitos activados (Gray-Owen y Blumberg 2006, *Nat Rev Immunol* 6, 433-46). El ensayo de proliferación de PBMC humano *ex vivo* reveló que CM10 no tiene efecto sobre la respuesta proliferativa de PBMC activada y no activada.

[0085] La principal ventaja de bloqueo de CEACAM1 sobre abrogación de mecanismos inhibitorios generalizados es la selectividad esperada para la vecindad del tumor y por lo tanto menos eventos adversos en comparación con otros agentes generales de toxicidad inmunes.

[0086] Como se demuestra en la presente invención, CM10 muestra la actividad alentadora y perfil de seguridad y es un candidato prometedor para la inmunoterapia del cáncer y se puede utilizar como una estrategia para mejorar selectivamente las propiedades antitumorales de la respuesta inmune endógena en varios tumores malignos, tales como melanoma y cáncer de pulmón no microcítico. La unión a subtipos adicionales de CEACAM aumenta el perfil terapéutico del anticuerpo, por lo que puede usarse para el diagnóstico y tratamiento de otros tipos de tumores malignos que no expresan ampliamente CEACAM1 pero expresan CEACAM5, por ejemplo.

[0088] Se ha encontrado CEACAM5 estaba sobreexpresada en un alto porcentaje de muchos tumores humanos, incluyendo el 90% de cánceres gastrointestinal, colorrectal (CRC) y de páncreas, el 70% de las células no pequeñas de cáncer de pulmón y el 50% de cánceres de mama. También se sobreexpresa en cánceres de tiroides, estómago, ovario y útero (Thompson, Grunert et al., 1991, *J Clin Lab Anal* 5, 344-66). CEACAM5 incluso sirve como un marcador clínico para la metástasis hepática en CCR y la vigilancia posquirúrgica del cáncer de colon (Duffy 2001, *Clin Chem* 47, 624-30). La evidencia de que CM10 es capaz de unirse a CEACA5 es muy importante y puede ampliar las posibles indicaciones que pueden ser tratadas por CM10 de 4 a 5 tipos de tumores malignos por encima de 10. Los agentes anti-CEACAM5 que han ingresado en ensayos clínicos incluyen anticuerpos anti-CEACAM5 conjugados con sustancias tóxicas tales como sustancias radiactivas para fines de diagnóstico y para el tratamiento de diversas malignidades. Parece que incluso estas formas conjugadas tóxicas no muestran problemas de seguridad, lo que puede indicar que CEACAM5 es un objetivo seguro.

[0089] Los homólogos humanos de las subclases de IgG murinos se basan en similitudes en las actividades biológicas y funcionales. IgG2a e IgG2b murinas e IgG1 e IgG3 humanas comparten la capacidad de fijar el complemento y unirse a antígenos proteicos (Hussain et al., 1995, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 726-732). IgG1 murina e IgG4 humana se consideran similares debido a su propiedad de unirse a los mastocitos. La IgG4 humana es la única subclase de IgG humana que no activa el complemento y las subclases IgG1 y 3 son las más efectivas para activar los complementos. Para el ratón, son las subclases IgG2a e IgG2b las que son activas, estando IgG1 y posiblemente IgG3 inactivas (Clark MR., *Chem Immunol*. 1997; 65: 88-110).

[0090] Varios anticuerpos monoclonales conocidos que reconocen CEACAM1 son del subtipo IgG1 de ratón. Ya que

el equivalente humano de IgG1 de ratón es IgG4, se esperaría que creara un anticuerpo quimérico que comprenda la estructura constante de IgG4 humana. Inesperadamente, los anticuerpos monoclonales quiméricos comprenden un marco constante de IgG1 humana.

- 5 **[0091]** De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que reconoce CEACAM1 humano, o un fragmento de anticuerpo del mismo, según la reivindicación 1. Otros aspectos y realizaciones de la presente invención se describen en el conjunto adjunto de reivindicaciones.

Definiciones

10 **[0092]** El término "CEACAM1" se usa para referirse al producto de proteína del gen por ejemplo CEACAM1, NP_001020083.1, NP_001703.2. En humanos, hasta el momento se han detectado 11 variantes diferentes de corte y empalme de CEACAM1. Las isoformas individuales de CEACAM1 difieren con respecto al número de dominios similares a inmunoglobulinas extracelulares (por ejemplo, CEACAM1 con cuatro dominios extracelulares similares a inmunoglobulinas se conoce como CEACAM1-4), anclaje de membrana y/o la longitud de su cola citoplásmica (por ejemplo, CEACAM1-4 con una cola citoplásmica larga se conoce como CEACAM1-4L y CEACAM1-4 con una cola citoplásmica corta se conoce como CEACAM1-4S). El dominio N-terminal de CEACAM1 comienza inmediatamente después del péptido señal y su estructura se considera de tipo IgV. Por ejemplo, en la anotación P13688 de CEACAM1, el dominio de tipo IgV N-terminal está compuesto por 108 aminoácidos, desde el aminoácido 35 hasta 142. Este dominio se identificó como responsable de la actividad de unión homofílica (Watt et al., 2001, Blood. 98, 1469-79). Todas las variantes, incluidas estas variantes de empalme se incluyen dentro del término "CEACAM1".

25 **[0093]** Un "anticuerpo anti-CEACAM1", "un anticuerpo que reconoce CEACAM1", "un anticuerpo contra CEACAM1", o "un anticuerpo a CEACAM1" es un anticuerpo que se une a la proteína CEACAM1 con suficiente afinidad y especificidad. Típicamente, un anticuerpo de acuerdo con las presentes enseñanzas es capaz de unirse a CEACAM1 con una afinidad mínima de aproximadamente 10^{-8} o 10^{-9} M. Algunos de los anticuerpos monoclonales de la presente invención son capaces de unirse a CEACAM3, 5 y/u 8 con una afinidad mínima de aproximadamente 5×10^{-7} M.

30 **[0094]** Preferiblemente, el anticuerpo anti-CEACAM1 de la invención se puede utilizar como un agente de diagnóstico o terapéutico en el reconocimiento e interfiriendo con enfermedades o condiciones en las que está involucrada la expresión o actividad de CEACAM1.

35 **[0095]** Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula capaz de inducir la formación de anticuerpos y de unirse por un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La reacción específica mencionada anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará, de una manera altamente selectiva, con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden evocarse por otros antígenos. Un antígeno de acuerdo con la presente invención es una proteína CEACAM1 o un fragmento de la misma.

40 **[0096]** El término "determinante antigénico" o "epítipo" de acuerdo con la invención se refiere a la región de una molécula de antígeno que reacciona específicamente con anticuerpo particular. Las secuencias peptídicas derivadas de un epítipo se pueden usar, solos o junto con un resto portador, aplicando métodos conocidos en la técnica, para inmunizar animales y producir anticuerpos policlonales o monoclonales adicionales. Los péptidos aislados derivados de un epítipo pueden usarse en métodos de diagnóstico para detectar anticuerpos y como agentes terapéuticos cuando se requiere la inhibición de dichos anticuerpos.

50 **[0097]** Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, comprenden dos cadenas pesadas unidas entre sí por enlaces de disulfuro y dos cadenas ligeras, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada respectiva por enlaces de disulfuro en una configuración en forma "Y". La digestión proteolítica de un anticuerpo produce dominios Fv (fragmento variable) y Fc (fragmento cristalino). Los dominios de unión a antígeno, Fab, incluyen regiones en las que varía la secuencia polipeptídica. El término $F(ab')_2$ representa dos brazos de Fab unidos por enlaces de disulfuro. El eje central del anticuerpo se denomina fragmento Fc. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes (C_H). Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante (C_L) en su otro extremo, el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada y el dominio constante de cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada ($CH1$). Los dominios variables de cada par de cadenas ligera y pesada forman el sitio de unión al antígeno. Los dominios de las cadenas ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco, cuyas secuencias están relativamente conservadas, unidas por tres dominios hipervariables conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR1-3). Estos dominios contribuyen con la especificidad y la afinidad del sitio de unión al antígeno. El isotipo de la cadena pesada (gamma, alfa, delta, épsilon o mu) determina la clase de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, respectivamente). La cadena ligera es cualquiera de los dos isotipos (kappa, κ o lambda, λ) que se encuentran en todas las clases de anticuerpos.

65 **[0098]** El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo longitud completa o anticuerpos monoclonales intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes,

anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiben la actividad biológica deseada.

5 **[0099]** El anticuerpo de acuerdo con la presente invención es una molécula que comprende al menos la porción de unión a antígeno de un anticuerpo. El anticuerpo o los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos intactos, tales como anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales (mAbs), así como fragmentos proteolíticos de los mismos tales como los fragmentos Fab o F(ab')₂. Además se incluyen dentro del alcance de la invención los anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanos y humanizados; anticuerpos recombinantes y modificados genéticamente, y fragmentos de los mismos. Además, el ADN que codifica la región variable del anticuerpo se puede insertar en el ADN que codifica otros anticuerpos para producir anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos monocatenarios también caen dentro del alcance de la presente invención.

15 **[0100]** "Fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, generalmente incluyendo un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y reteniendo de este modo la capacidad de unirse a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos abarcados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd que tiene dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd' que tiene dominios VH y CH1 y uno o más restos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward et al., Nature 1989, 20 341, 544-546) que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, Fv de cadena simple, scFv) (Bird et al., Science 1988, 242, 423 - 426, y Huston et al., PNAS (EE.UU.) 1988, 85, 5879 - 5883); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097, WO 93/11161; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444 - 6448); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al., Protein Eng., 1995, 8, 1057 - 1062 y la patente de Estados Unidos N° 5.641.870).

30 **[0101]** Los anticuerpos de cadena única pueden ser polipéptidos compuestos de cadena sencilla que tienen capacidades de unión a antígeno y que comprenden secuencias de aminoácidos homólogas o análogas a las regiones variables de una cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, es decir, V_H-V_L enlazado o Fv de cadena sencilla (scFv).

35 **[0102]** Un "anticuerpo neutralizante", como se usa aquí se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno a un objetivo receptor o ligando específico capaz de reducir o inhibir (bloquear) la actividad o la señalización a través de un receptor, como se determina por ensayos *in vivo* o *in vitro*, según la especificación.

40 **[0103]** El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse por requerir la producción del anticuerpo por ningún método particular. Los mAb se pueden obtener por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 1975, 256, 495, o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature 1991, 352, 624-628 o Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222: 581 - 597, por ejemplo.

55 **[0104]** Los mAbs de la presente invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA. Un hibridoma que produce un mAb puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Se pueden obtener altos títulos de mAbs en la producción *in vivo* donde las células de los hibridomas individuales se inyectan por vía intraperitoneal en ratones Balb/c cebados con pristina para producir fluido de ascitis que contiene altas concentraciones de los mAbs deseados. Los mAb de isotipo IgM o IgG pueden purificarse a partir de tales fluidos ascíticos, o de sobrenadantes de cultivo, usando métodos de cromatografía en columna bien conocidos por los expertos en la técnica.

60 **[0105]** Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular correspondiente o perteneciente a una clase de anticuerpo particular o subclase, mientras que el resto de la cadena es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos

Nº 4.816.567 y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 - 6855 (1984)). Además, el injerto de la región determinante de la complementariedad (CDR) se puede realizar para alterar ciertas propiedades de la molécula de anticuerpo que incluyen afinidad o especificidad. Un ejemplo no limitante de injerto de CDR se describe en la patente de EE.UU. 5.225.539.

5
10
15
[0106] Los anticuerpos quiméricos son moléculas, las diferentes porciones de las cuales se derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos que tienen residuos de marco de región variable sustancialmente de anticuerpo humano (denominado anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (denominado anticuerpo de donante) también se denominan anticuerpos humanizados. Los anticuerpos quiméricos se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos en la producción, por ejemplo, donde los mAbs murinos tienen rendimientos más altos de hibridomas pero mayor inmunogenicidad en humanos, de forma que se usan mAbs quiméricos humanos/murinos. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (por ejemplo, las solicitudes de patente PCT WO 86/01533, WO 97/02671, WO 90/07861, WO 92/22653 y las patentes de los EE.UU. 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, 5.530.101 y 5.225.539).

20
25
30
[0107] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature 1986, 321, 522-525; Riechmann et al., Nature 1988, 332, 323 - 329; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992 2, 593 - 596.

35
40
45
50
55
[0108] Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se describe en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. El anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., Nature Biotechnology 1996, 14, 309-314; Sheets et al., PNAS (EE.UU.), 1998, 95, 6157 - 6162); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 1991, 227, 381; Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222, 581). Los anticuerpos humanos también se pueden preparar introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. N^{os}. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5,625,126; 5,633,425; 5.661.016, y en las siguientes 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); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65 - 93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse por inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado in vitro). Véase, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86 - 95 (1991); y la Patente de Estados Unidos Nº 5.750.373.

60
65
[0109] Por el término "fragmento variable monocatenario (scFv)" se entiende una fusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, unidas entre sí con un enlazador corto (habitualmente serina, glicina). Anticuerpos de cadena sencilla pueden ser polipéptidos compuestos de cadena sencilla que tienen capacidades de unión a antígeno y que comprenden secuencias de aminoácidos homólogos o análogos a las regiones variables de una inmunoglobulina ligera y la cadena pesada (V_H-V_L enlazado o Fv de cadena sencilla (scFv)). Tanto V_H como V_L pueden copiar secuencias de anticuerpos monoclonales naturales o una o ambas de las cadenas pueden comprender una construcción de CDR-FR del tipo descrito en la patente de los Estados Unidos 5.091.513. Los polipéptidos separados análogos a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada se mantienen juntos mediante un enlazador polipeptídico. Los métodos de producción de dichos anticuerpos de cadena única, particularmente cuando el ADN que codifica las estructuras polipeptídicas de las cadenas V_H y V_L son conocidos, se pueden realizar de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes US 4.946.778,

5.091.513 y 5.096.815.

5 **[0110]** Una "molécula que tiene la parte de unión a antígeno de un anticuerpo" tal como se usa en este documento pretende incluir no sólo las moléculas de inmunoglobulina intactas de cualquier isotipo y generadas por cualquier línea celular animal o microorganismo, sino también la fracción reactiva de unión al antígeno, que incluyen, pero no se limitan al fragmento Fab, al fragmento Fab', al fragmento F(ab')₂, a la porción variable de las cadenas pesadas y/o ligeras, minianticuerpos Fab (véase el documento WO 93/15210, Solicitud de patente de Estados Unidos 08/256.790, WO 96/13583, solicitud de patente de Estados Unidos 08/817.788, WO 96/37621, solicitud de patente de Estados Unidos 08/999.554), minianticuerpos biespecíficos diméricos (véase Muller et al., 1998) y quiméricos o anticuerpos de cadena única que incorporan dicha fracción reactiva, así como cualquier otro tipo de molécula o célula en la que dicha fracción reactiva de anticuerpo se haya insertado físicamente, tal como un receptor quimérico de células T o una célula T que tenga dicho receptor, o moléculas desarrolladas para proporcionar restos terapéuticos por medio de una parte de la molécula que contiene dicha fracción reactiva. Dichas moléculas se pueden proporcionar mediante cualquier técnica conocida, que incluye, pero no se limita a, escisión enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes.

20 **[0111]** Los anticuerpos según la invención pueden obtenerse mediante la administración de CEACAM1, o fragmentos portadores de epítopos, análogos, o células, a un animal, preferiblemente no humano, usando protocolos de rutina. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica conocida en la técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de línea celular continua. Los ejemplos incluyen diversas técnicas, tales como las de Kohler, G. y Milstein, C., Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., Pg. 77-96 en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. (1985).

25 **[0112]** Además del método convencional para generar anticuerpos *in vivo*, los anticuerpos se pueden generar *in vitro* usando la tecnología de presentación en fagos. Tal producción de anticuerpos recombinantes es mucho más rápida en comparación con la producción convencional de anticuerpos y se pueden generar contra una enorme cantidad de antígenos. Además, cuando se usa el método convencional, muchos antígenos demuestran ser no inmunogénicos o extremadamente tóxicos, y por lo tanto no pueden usarse para generar anticuerpos en animales. Además, la maduración de la afinidad (es decir, aumentar la afinidad y la especificidad) de los anticuerpos recombinantes es muy simple y relativamente rápida. Finalmente, se puede generar un gran número de anticuerpos diferentes contra un antígeno específico en un procedimiento de selección. Para generar anticuerpos monoclonales recombinantes, se pueden usar diversos métodos, todos basados en bibliotecas de visualización, para generar un conjunto grande de anticuerpos con diferentes sitios de reconocimiento de antígenos. Dicha biblioteca se puede hacer de varias maneras: se puede generar un repertorio sintético clonando regiones de CDR3 sintéticas en un conjunto de genes de línea germinal de cadena pesada y generando así un gran repertorio de anticuerpos, a partir del cual se pueden seleccionar fragmentos de anticuerpos recombinantes con diversas especificidades. Se puede usar el conjunto de linfocitos humanos como material de partida para la construcción de una biblioteca de anticuerpos. Es posible construir repertorios ingenuos de anticuerpos IgM humanos y así crear una biblioteca humana de gran diversidad. Este método ha sido ampliamente utilizado con éxito para seleccionar una gran cantidad de anticuerpos contra diferentes antígenos. Los protocolos para la construcción de bibliotecas de bacteriófagos y la selección de anticuerpos recombinantes se proporcionan en el texto de referencia bien conocido Current Protocols in Immunology, Colligan et al (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), Capítulo 17, Sección 17.1.

45 **[0113]** Los anticuerpos no humanos se pueden humanizar mediante cualquier método conocido en la técnica. En un método, las regiones determinantes de la complementariedad no humana (CDR) se insertan en un anticuerpo humano o secuencia de marco de anticuerpo de consenso. Se pueden introducir cambios adicionales en el marco del anticuerpo para modular la afinidad o la inmunogenicidad.

50 **[0114]** Por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.585.089 de Queen et al. describe una inmunoglobulina humanizada y métodos de preparación de la misma, en donde la inmunoglobulina humanizada comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina donante y marcos de región variable de cadena pesada y ligera de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina aceptora humana, donde dicha inmunoglobulina humanizada comprende aminoácidos del marco de inmunoglobulina donante fuera de las CDR de Kabat y Chothia, en las que los aminoácidos donantes reemplazan los aminoácidos correspondientes en los marcos de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina aceptora.

60 **[0115]** La patente US 5.225.539, de Winter, también describe un anticuerpo alterado o fragmento de unión a antígeno del mismo y métodos de preparación del mismo, donde un dominio variable del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene las regiones marco de un dominio variable de cadena pesada o ligera de primera inmunoglobulina y las regiones determinantes de complementariedad de un segundo dominio variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, donde dicho segundo dominio variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina es diferente de dicho primer dominio variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina en especificidad de unión a antígeno, afinidad de unión a antígeno, especie, clase o subclase.

65 **[0116]** También se comprenden anticuerpos antiidiotípicos específicamente inmunorreactivos con un anticuerpo de

la invención.

[0117] Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios para polipéptidos o polinucleótidos como se describe en el presente documento. Además, los ratones transgénicos u otros organismos tales como otros mamíferos pueden usarse para expresar anticuerpos humanizados inmunoespecíficos para los polipéptidos o polinucleótidos como se describe en este documento.

[0118] Alternativamente, la tecnología de presentación en fagos puede utilizarse para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión hacia un polipéptido como se describe a continuación a partir de repertorios de genes *v* amplificados por PCR de linfocitos de seres humanos seleccionados por poseer anti-CEACAM1 o a partir de bibliotecas (McCafferty, et al., 1990, Nature 348, 552 - 554; Marks, et al., 1992, Biotechnology 10, 779 - 783). La afinidad de estos anticuerpos también se puede mejorar mediante, por ejemplo, barajado de cadenas (Clackson et al., 1991, Nature 352: 628).

[0119] Los anticuerpos descritos anteriormente pueden emplearse para aislar o identificar clones que expresan los polipéptidos para purificar los polipéptidos mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

[0120] También se describen variantes de aminoácidos conservativas de las moléculas de anticuerpo. También se pueden hacer variantes que conserven la estructura molecular general de las proteínas codificadas. Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales que comprenden los productos de proteína descritos, el experto en la materia reconocerá algunas sustituciones racionales. Las sustituciones de aminoácidos, es decir, "sustituciones conservativas", pueden realizarse, por ejemplo, sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados.

[0121] Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en la presente memoria incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y tumores malignos linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrófágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos, inmunológicos o estados de hiperpermeabilidad.

[0122] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del medicamento puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

[0123] "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

[0124] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de melanoma, pulmón, tiroides, mama, colon, próstata, hígado, vejiga, renal, cervical, pancreático, leucemia, linfoma, mieloides, ovario, útero, sarcoma, biliar o endometrial.

[0125] El anticuerpo de la presente invención se puede unir a un resto citotóxico o terapéutico. El resto citotóxico o terapéutico puede ser, por ejemplo, un resto citotóxico, un resto tóxico, un resto de citocina, un resto de anticuerpo biespecífico, una citotoxina, una quimioquina, una quimioterapia, un proapoptótico, un interferón, un resto radiactivo, o combinaciones de los mismos, cuyos ejemplos se proporcionan a continuación.

[0126] El término "composición anti-neoplásica" se refiere a una composición útil en el tratamiento de cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo capaz de inhibir o prevenir el crecimiento o la función de tumor, y/o causa la destrucción de las células tumorales. Los agentes terapéuticos adecuados en una composición antineoplásica para tratar el cáncer incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos, isótopos radiactivos, toxinas, citocinas tales como interferones y agentes antagonistas dirigidos a citoquinas, receptores de citocinas o antígenos asociados con células tumorales.. Preferiblemente, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

[0127] Como se usa en este documento, el término "diagnóstico" se refiere a determinar la presencia o ausencia de

una patología, clasificar una patología o un síntoma, determinar la gravedad de la patología, controlar la progresión de la patología, pronosticar un resultado de una patología y/o perspectivas de recuperación.

Farmacología

[0128] La presente invención también contempla formulaciones farmacéuticas para uso médico humano, que comprenden como agente activo al menos un anticuerpo de la presente invención, para la fabricación de una composición terapéutica o de diagnóstico para el tratamiento, diagnóstico o profilaxis de las condiciones descritas aquí.

[0129] En tales formulaciones farmacéuticas y de medicamentos, el agente activo se utiliza preferiblemente junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico. El vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no indebidamente perjudicial para el receptor. El agente activo se proporciona en una cantidad efectiva para lograr el efecto farmacológico deseado, como se describió anteriormente, y en una cantidad apropiada para alcanzar la dosis diaria deseada.

[0130] Típicamente, las moléculas como se describen en este documento comprenden la porción de unión a antígeno de un anticuerpo o que comprenden otro polipéptido que incluye un peptidomimético se suspenderán en una solución salina estéril para usos terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse alternativamente para controlar la liberación de ingrediente activo (molécula que comprende la porción de unión a antígeno de un anticuerpo) o para prolongar su presencia en el sistema de un paciente. Se conocen numerosos sistemas de administración de fármacos adecuados e incluyen, por ejemplo, sistemas de liberación de fármacos implantables, hidrogeles, hidroximetilcelulosa, microcápsulas, liposomas, microemulsiones, microesferas y similares. Las preparaciones de liberación controlada pueden prepararse mediante el uso de polímeros para formar complejos o adsorber la molécula. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebárico. La velocidad de liberación de la molécula como se describe aquí, es decir, de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, a partir de dicha matriz depende del peso molecular de la molécula, la cantidad de la molécula dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersas.

[0131] La composición farmacéutica de esta invención puede administrarse por cualquier medio adecuado, tal como por vía oral, tópica, intranasal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraarticular, intralesional o parenteral. Ordinariamente, se preferirá la administración intravenosa (iv), intraarticular, tópica o parenteral.

[0132] Será evidente para los expertos en la técnica que la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula como se describe aquí dependerá, entre otros, del programa de administración, de la dosis unitaria de molécula administrada, ya sea que la molécula se administre en combinación con otros agentes terapéuticos, el estado inmune y la salud del paciente, la actividad terapéutica de la molécula administrada y el juicio del médico tratante. Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de una molécula requerida para aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno que se trata durante un período de tiempo.

[0133] Aunque una dosificación apropiada de una molécula como se describe aquí varía dependiendo de la ruta de administración, tipo de molécula (polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica etc.) edad, peso corporal, sexo o condiciones del paciente, y debe determinarse por el médico al final, en el caso de la administración oral, la dosificación diaria generalmente puede estar entre aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg, preferiblemente aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, por kg de peso corporal. En el caso de la administración parenteral, la dosificación diaria puede estar generalmente entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 100 mg, preferiblemente entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 10 mg, más preferiblemente entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 1 mg, por kg de peso corporal. La dosificación diaria puede administrarse, por ejemplo, en regímenes típicos de 1 - 4 administración individual diaria. Otros métodos de administración preferidos incluyen la administración intraarticular de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal. Se describen diversas consideraciones para llegar a una cantidad efectiva, por ejemplo, en Goodman y Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press, 1990; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990.

[0134] Regímenes de dosificación adecuados de quimioterapias de combinación son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Saltz et al. Proc ASCO 1999, 18, 233a y Douillard et al., Lancet 2000, 355, 1041-7.

[0135] Las moléculas como se describe en el presente documento como ingredientes activos se disuelven, se dispersan o se mezclan en un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y compatible con el ingrediente activo como es bien sabido. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, si lo desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH.

[0136] La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar junto con una composición anti-neoplásica. La composición antineoplásica puede comprender al menos un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico, que podría administrarse junto con el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o por separado, puede comprender cualquier agente conocido en la técnica que muestre actividad anticancerosa, que incluye pero no se limita a: mitoxantrona, inhibidores de topoisomerasa, vincas de veneno fusiforme: vinblastina, vincristina, vinorelbina (taxol), paclitaxel, docetaxel; agentes alquilantes: mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida; metotrexato; 6-mercaptopureína; 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina; podofilotoxinas: etopósido, irinotecán, topotecán, dacarbacina; antibióticos: doxorubicina (adriamicina), bleomicina, mitomicina; nitrosoureas: carmustina (BCNU), lomustina, epirubicina, idarrubicina, daunorrubicina; iones inorgánicos: cisplatino, carboplatino; interferón, asparaginasa; hormonas: tamoxifeno, leuprolida, flutamida y acetato de megestrol.

[0137] El agente quimioterapéutico puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores relacionados, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-asparaginasa, inhibidor de la topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, urea sustituida por antracenediona, derivados de metilhidrazina, supresor adrenocortical, adrenocorticosteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógeno, andrógenos, antiandrógeno y análogo de la hormona liberadora de gonadotropina. El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina (LV), irenotecán, oxaliplatino, capecitabina, paclitaxel y doxetaxel. Se pueden usar dos o más agentes quimioterapéuticos en un cóctel para ser administrados en combinación con la administración del anticuerpo anti-CEACAM1.

[0138] Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar cómo preparar y utilizar los anticuerpos y otros aspectos de esta invención y de ninguna manera deben interpretarse como una limitación. Aunque la invención se describirá ahora junto con las realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. En consecuencia, se pretende abarcar todas las modificaciones y variaciones que quepan dentro del espíritu y alcance amplio de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

[0139] Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. A continuación se proporciona una descripción que ejemplifica técnicas para la producción, caracterización y uso de anticuerpos anti-CEACAM1 de acuerdo con la presente invención.

[0140] Generalmente, la nomenclatura usada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., 1989; "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland 1989; Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York 1988; Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York 1998; metodologías expuestas en N^{os} de pat. de EE.UU. 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" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. 1994; Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT 1994; Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York 1980; los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N^{os}. 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., "Estr Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press 1996. Se cree que los procedimientos son bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 1: Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales que reconocen CEACAM

[0141] Los anticuerpos monoclonales que bloquean de manera efectiva las interacciones homofílicas CEACAM1 in vitro a concentraciones nanomolares se generaron mediante la inmunización de ratones con la proteína CEACAM1 humana recombinante. Los hibridomas que producen los anticuerpos bloqueadores de CEACAM1 se produjeron y se volvieron a clonar varias veces para producir un clon estable.

[0142] La secuencia de ADN y de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal ejemplar que reconoce CEACAM1 se determinó por Fusion Antibodies Ltd. ARNm se extrajo de los sedimentos celulares de hibridoma y el ARN total se extrajo de los sedimentos utilizando el protocolo de extracción de ARN. El ADNc de RT-PCR se creó a partir del ARN mediante transcripción inversa con un cebador oligo (dT). Se usaron reacciones de PCR usando cebadores de

dominio variable para amplificar tanto las regiones VH como VL del ADN del anticuerpo monoclonal.

[0143] Los productos de VH y VL se clonaron en el vector de secuenciación de Invitrogen pCR2.1 y se transformaron en TOP10 para transformadores positivos. Las colonias seleccionadas se seleccionaron y se analizaron mediante secuenciación. Las secuencias de ADN y aminoácidos resultantes determinadas son:

Cadena pesada variable (VH)

Secuencia de ADN del dominio VH:

10 ATGGGATGGACCTTGGTCTTTCTCTTTCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTTCACTC
 CCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGT
 15 GAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCTTCACTAATAACTTGATAGAGTGG
 GTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGA
 AGTGGTGATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCA
 20 GACAAATCCTCCAACACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACT
 CTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGATTACTACGGTGGCTTTGCTGTGGACTA
 CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCC
 25 GTTTATCCCTTGGCCCCCTGGAAGCTTGGG (SEQ ID NO: 25).

Secuencia de aminoácidos del dominio VH:

30 QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNNLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSG
 DTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARGDYGGFAVDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID NO:
 26).

Cadena ligera variable (VL)

Secuencia de ADN del dominio VL:

40 ATGGTGTCTCAGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGAACCAG
 ATGTGATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGCTGCTCTCTGGGAGAC
 AGAGTCACCATCAGTTGCAGGACAAGTCAGGACATTGGCAATTATTTAAACTGG
 TATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGAT
 45 TACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATC
 TCTACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAG
 GGTAAGGCTTCCCTCGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGTTGGAAATCAAACGG
 50 GCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACAT
 CTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAGAGA (SEQ ID
 NO: 27).

Secuencia de aminoácidos del dominio VL:

60 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
 PSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKSLPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
 28).

La secuenciación de aminoácidos N-terminal y el análisis de espectros de masas se usaron para confirmar las identidades de VL y VH.

Ejemplo 2: Verificación de la secuencia de aminoácidos N-terminal

[0144] El análisis de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se realizó mediante el método de degradación de Edman para verificar la secuencia N-terminal de la cadena ligera de uno de los anticuerpos monoclonales. La secuencia N-terminal obtenida fue: DIQMTQTSS (SEQ ID NO: 29), que está de acuerdo con la secuencia N-terminal esperada basada en la secuencia de ADN.

Ejemplo 3: Secuencias de la región de determinación complementaria (CDR)

[0145] Los segmentos de CDR se identificaron usando dos métodos de algoritmo diferentes:

1. Algoritmo de IMGT (Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Research, 27, 209-212);
2. Algoritmo de KABAT (Wu TT y Kabat EA, 1970, J. Exp. Med. 132, 211-250).

[0146] La Tabla 1 resume las secuencias de CDR determinadas usando los dos métodos, así como la secuencia de consenso mínimo y la secuencia combinada de secuencias identificadas usando ambos métodos.

Tabla 1. Secuencias de CDR

	VH1	VH2	VH3	VL1	VL2	VL3
IMGT	GYAFTNNL (SEQ ID NO: 13)	INPGSGDT (SEQ ID NO: 14)	ARGDYGG FAVDY (SEQ ID NO: 15)	QDIGNY (SEQ ID NO: 16)	YTSR (SEQ ID NO: 17)	QQGKSLPR T (SEQ ID NO: 18)
KABAT	NNLIE (SEQ ID NO: 7)	VINPGSGDT NYNEKFKG (SEQ ID NO: 8)	GDYGGFA VDY (SEQ ID NO: 9)	RTSQDIGNY LN (SEQ ID NO: 10)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 11)	QQGKSLP (SEQ ID NO: 12)
Secuencia combinada	GYAFTNNLIE (SEQ ID NO: 19)	VINPGSGDT NYNEKFKG (SEQ ID NO: 20)	ARGDYGG FAVDY (SEQ ID NO: 21)	RTSQDIGNY LN (SEQ ID NO: 22)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 23)	QQGKSLPR T (SEQ ID NO: 24)
Secuencia de consenso	X ₁ NNLX ₂ * (SEQ ID NO: 1)	INPGSGDT (SEQ ID NO: 2)	GDYGGFA VDY (SEQ ID NO: 3)	QDIGNY (SEQ ID NO: 4)	YTSR (SEQ ID NO: 5)	QQGKSLP (SEQ ID NO: 6)

* en el que X₁ está ausente o es Thr (T) y X₂ está ausente o es Ile (I)

Ejemplo 4: Diseño y producción de un anticuerpo monoclonal quimérico

[0147] La secuencia de ADN de las cadenas pesadas y ligeras variables (SEQ ID NOs 25 y 27) se utilizaron para construir un anticuerpo quimérico, que comprende los dominios constantes de isotipo IgG1 humano y dominio IgKappa humano ligero constante (CL). Aunque el anticuerpo monoclonal original es IgG1 de ratón y su equivalente humano es IgG4, se usó un marco de IgG1 humano para construir algunos de los anticuerpos quiméricos de la presente invención. Las secuencias de ADN para la cadena ligera y la cadena pesada se sintetizaron y se clonaron en el vector de expresión pFUSION-DHFR1 en promotores separados.

Transfección transitoria de células CHO

[0148] Se cultivaron células CHO en suspensión (Invitrogen, Reino Unido) a 130 rpm, 8% de CO₂, 37°C en medio libre de suero de Pro CHO 5 (Lonza, Reino Unido) en frascos Erlenmeyer ventilados de 250 y 500 ml (Corning, Países Bajos). El día de la transfección, las células se sembraron a una densidad de 2,0 x 10⁶ células/ml, 2,5 g/ml de ADN de plásmido (Geneart, Alemania) se transfectaron en las células usando polietilenimina (Polysciences Inc, PA, EE.UU.). Los cultivos transfectados se incubaron a 130 rpm, 8% de CO₂, 37°C durante 9 - 10 días. Antes de cosechar los sobrenadantes de cultivo se centrifugaron a 4.000 rpm durante 40 minutos.

[0149] Se recogió el medio y se purificó en dos lotes separados. El medio se filtró a través de un filtro de giroscopio de 0,8 µm y se purificó usando una columna de Proteína A de 1 ml. El anticuerpo se purificó por FPLC. Se cargaron 320 ml de muestra a 0,2 ml/min durante la noche y se aumentó a 0,5 ml/min después de 17 horas. La columna se lavó/se equilibró con PBS a 0,5 ml/min antes de la elución con tampón de elución a pH 3,0 Gly/HCL. Se observó un buen pico y las fracciones 1 a 5 se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford. El ensayo de Bradford mostró proteína presente en las fracciones 1-4 que se combinaron y se dializaron para intercambio de tampón durante la noche en 1 litro de PBS (4°C, 120 RPM). Se observó una concentración de 1,823 mg/ml para la muestra de 4 ml, por lo que se purificó un rendimiento total de aproximadamente 7,32 mg. En el segundo lote, los resultados del ensayo de Bradford mostraron proteína presente en las fracciones 1-3 que se agruparon y se dializaron. A partir de los 320 ml de medio acondicionado, se purificó un rendimiento total de aproximadamente 7,32 mg (lote A). A partir de un cultivo de 910 ml, se purificó un rendimiento total de aproximadamente 15,74 mg (lote B). La expresión transitoria

total produjo aproximadamente 23 mg de proteína purificada. Después de las determinaciones de concentración y el análisis SDS/PAGE, se obtuvieron 19,65 mg del anticuerpo quimérico. Las muestras de anticuerpos purificados se analizaron mediante SDS-PAGE para evaluar la pureza. La Figura 1 representa la imagen de gel de SDS-PAGE que muestra cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo quimérico. El análisis MS reveló que el peso molecular de la cadena pesada CM10 es de 48,6 kDa y de la cadena ligera es de 23,3 kDa.

[0150] El anticuerpo resultante, denominado CM10, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera:

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada (sin péptido de señal):

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNNLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSG
DTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSDDSA VYFCARGDY YGGFAVDYWG
QGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 30).

El dominio variable está en negrita, los CDR según IMGT están subrayados.
 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (sin péptido de señal):

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSG
VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQOGKSLPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKIYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

El dominio variable está en negrita, los CDR según IMGT están subrayados.

[0151] Un plásmido que contiene las secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal quimérico ejemplar denominado CM10 se depositó el 28 de septiembre de 2011 con el número de acceso ATCC PTA-12130.

Ejemplo 5: Caracterización de afinidad del anticuerpo monoclonal quimérico CM10

Unión de CM10 a CEACAM1 humano purificado

[0152] La especificidad de unión de CM10 a CEACAM1 humana se ensayó en ensayo ELISA usando CEACAM1 humano purificado. El ELISA indirecto que usa 23 diluciones dobles de CM10 se usó para generar una curva de unión específica. Los resultados que se muestran en la Figura 2 representan O.D. promedio de \pm SE por triplicado. Se obtuvieron resultados similares de otros diez experimentos independientes.

[0153] Para examinar si el proceso de quimerización afecta la afinidad de unión del anticuerpo, se evaluó el anticuerpo quimérico CM10 para la unión a CEACAM1 mediante ELISA competitivo y mediante análisis BIAcore.

[0154] Para el ELISA, se unió a la placa CEACAM1 humana purificada recombinante. El CM10 químicamente biotinilado se usó como trazador a una concentración constante y compitió con concentraciones crecientes de CM10 sin marcar. Después de la incubación y el lavado, la placa se desarrolló con un conjugado StrepAvidin-HRP y la reacción de color se desarrolló con TMB como sustrato de HRP.

[0155] Usando 50 ng/ml de marcador, los valores de afinidad aparente detectados para CM10 fueron 1,2-1,6 nM.

Análisis BIAcore

[0156] Cada anticuerpo se inmovilizó en un solo canal de un chip sensor CM5 del instrumento Biacore3000 mediante la química de acoplamiento NHS-EDC.

[0157] Se hizo fluir CEACAM1 recombinante a 50 µl/min sobre el chip en diversas concentraciones (0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5 y 25 nM). El tampón en marcha fue PBS-ET (10 mM de tampón p, pH 7,4, 150 mM de NaCl, EDTA 3,4 mM y Tween 20 al 0,005%). Los datos se analizaron usando el software BIAEvaluation 3.0 y los valores KD de la afinidad CM10-CEACAM1, calculados a partir de tres experimentos independientes (KD): 4,07 - 5,05 nM (4,56 nM promedio).

Especificidad de unión de CM10 a CEACAM1 endógeno unido a membrana

[0158] Para probar la unión de CM10 a CEACAM1 endógeno unido a membrana, se realizó un análisis de FACS. Se seleccionaron varias líneas celulares de melanoma humano para la expresión de hCEACAM1, mientras que la línea celular 526mel se usó como control positivo y 003mel como línea de control negativa. Las líneas celulares 526mel, 003mel, Malme 3M, Skmel 5 y A375 se tiñeron con CM10. Los histogramas vacíos representan la tinción de mAb mientras que los histogramas más oscuros representan la tinción de fondo. Se usaron al menos 5.000 células para analizar la expresión de CEACAM1 en cada histograma.

[0159] Como se puede apreciar en la figura 3, CM10 detecta CEACAM1 endógeno unido a la membrana. Las líneas celulares Malme3M y Skmel5 mostraron alta expresión de CEACAM1 mientras que no se pudo detectar expresión en la línea celular de melanoma A375.

Conclusión

[0160] El proceso de quimerización se llevó a cabo con éxito. El anticuerpo quimérico se une a CEACAM1 con una afinidad de 1,4 nM validado por dos enfoques diferentes. El análisis FACS que prueba la especificidad de unión de CM10 a varias líneas celulares de melanoma demuestra que el anticuerpo retuvo su capacidad de unión biológica.

Ejemplo 6. Evaluación de la actividad de CM10

Bloqueo del ensayo de interacción célula-célula

[0161] El ensayo que determina la capacidad de los mAb anti CEACAM1 para bloquear la interacción de CEACAM1 célula-célula utiliza células T murinas (células BW) que están transfectadas establemente con una molécula quimérica compuesta de la porción extracelular de CEACMA1 humano fusionado a ratón de cadena z (BW/CEACAM1). El acoplamiento de CEACAM1 mediante co-incubación de células BW/CEACAM1 con células B transfectadas de manera estable con CEACAM1 (221/CEACAM1), conduce a la secreción de IL-2 de ratón, mediada por la cadena z.

Las células efectoras (BW, que expresan CEACAM1) se incubaron en presencia de CM10 o PBS durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células efectoras se cocultivaron durante la noche con células diana que expresan CEACAM1 (221+) o negativas a CEACAM1 (221-). La secreción de IL-2 de ratón se midió mediante ELISA comercial. Los resultados que se muestran en la Figura 4 representan la secreción media de IL-2 de pocillos duplicados. Como se muestra en la figura, tras la adición de CM10, las interacciones célula-célula mediadas por CEACAM1 entre las células T y B se abolieron de una manera dependiente de la dosis como se indica mediante el bloqueo de la secreción de IL-2.

Ensayos de destrucción inmunomoduladora in vitro

[0162] El ensayo de eliminación de células T: células T reactivas para melanoma TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes, derivados de pacientes con melanoma) pueden destruir células de melanoma con HLA compatible. Los TIL se compraron al Instituto ELLA en el centro médico de Shiba y se cultivaron de acuerdo con los protocolos del laboratorio clínico. Las células de melanoma marcadas con CFSE (SKme15) incubadas con CM10 (10 µg/ml) durante 30 minutos en hielo. Se añadieron TIL durante 10 horas adicionales de incubación a 37°C. El porcentaje de muerte se determinó mediante tinción con PI de las células de melanoma marcadas con CFSE. La relación efector-objetivo era 5:1. En otro ensayo, las células de melanoma marcadas con CFSE se preincubaron con CM10 durante 30 minutos en hielo. Se añadieron TIL durante 5 horas adicionales de incubación a 37°C. El porcentaje de muerte se determinó mediante tinción con PI de las células de melanoma marcadas con CFSE. Los resultados representan el % de destrucción media específica de pocillos por triplicado ±SE por tratamiento. La relación efector-objetivo fue de 5:1.

[0163] Los resultados descritos en la Figura 5 muestran que la actividad de eliminación de las células T se mejora en presencia de los anticuerpos mAb anti CEACAM1, CM10. Además, en condiciones de ensayo donde las TIL no pueden matar ninguna célula de melanoma (incubación corta o relación de TIL baja), la adición de CM10 estimuló la actividad de eliminación de las TIL mientras que no se pudo detectar la muerte con el control del isotipo IgG1 (Figura 6).

Ensayo de eliminación de células NK

[0164] Las células asesinas naturales (células NK) son un tipo de linfocito citotóxico que pueden destruir células malignas mediante la liberación de pequeñas proteínas llamadas perforina y granzima que hacen que la célula diana mueran por apoptosis. Las células NK pueden activarse lanzando varias rutas diferentes entre ellas, citoquinas, receptor de FC y ausencia de clase 1 de MHC en las células diana. Varios receptores de activación e inhibición de diversos ligandos en las células diana regulan la actividad de citotoxicidad final de las células NK. Las células NK 92MI son líneas celulares NK independientes de IL-2 que se compraron de la ATCC.

[0165] NK 92MI se incubaron con CM10 (0,2 µg/ml, 1 µg/ml o 5 µg/ml) o control de coincidencia de isotipo Ab (5 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C, las células diana que expresan CEACAM1 se añadieron durante 5 horas adicionales. El porcentaje de muerte se determinó mediante el ensayo de liberación de LDH clásico. Los resultados representan el % de promedio de citotoxicidad de pocillos por triplicado \pm SE por tratamiento. La relación efecto-objetivo fue 2.5:1.

[0166] El ensayo descrito en la Figura 7 muestra que CM10 mejora fuertemente la actividad de matar las células NK en dos líneas celulares de melanoma que expresan CEACAM1 (SKMel 5 y G361), en comparación con PBS o isotipo IgG. Se han demostrado resultados similares en otras dos líneas celulares de CEACAM1+ melanoma y en diversas relaciones efector a objetivo (E:T).

Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos

[0167] Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo de la inmunidad mediada por células mediante la cual una célula efectora del sistema inmune (en su mayoría células NK) lisa activamente células diana que han sido unidas por un anticuerpo específico. Para acceder al perfil de seguridad de CM10, hemos realizado un ensayo preliminar de ADCC donde se examinó la capacidad de CM10 para inducir ADCC en tres líneas de células de melanoma (líneas celulares positivas de CEACAM1: línea celular negativa G361 y SKmel5 y CEACAM1: SKmel28).

[0168] Se examinó la capacidad de CM10 para inducir ADCC en comparación con un anticuerpo de control positivo (Ab policlonal contra CEACAM1 que mostró actividad de ADCC en el experimento preliminar). El anticuerpo de isotipo combinado sirvió como control negativo (hIgG1 K). Los resultados indican que CM10 no dispara ADCC en la configuración probada.

Citotoxicidad dependiente del complemento

[0169] Las proteínas del complemento se encuentran en la sangre y su acción "complementa" el trabajo de los anticuerpos. La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) es un mecanismo para matar células en las que el anticuerpo unido a la superficie celular fija el complemento, da como resultado el ensamblaje del complejo de ataque de membrana que crea poros en la membrana celular objetivo y finalmente conduce a lisis celular.

[0170] Para acceder al perfil de seguridad de CM10, se examinó la capacidad de CM10 para inducir CDC en dos líneas celulares de melanoma (SKmel28 y SKmel5) que expresan CEACAM1. El suero humano agrupado comercial se usó como fuente de proteínas del complemento. El anticuerpo monoclonal comercial Rituximab incubado con células Daudi se usó como control positivo del ensayo e IgG1K comercial como control del isotipo para CM10. Las líneas celulares de melanoma - SKMEL5 y SKMEL28 o células Daudi de control positivo se incubaron con CM10 o Rituximab respectivamente durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de la adición de suero humano normal a una concentración final del 50% durante 2 horas adicionales en una incubadora humidificada (37°C, 5% de CO₂). El porcentaje de células lisadas se determinó mediante tinción de yodo de propidio (PI). Los resultados (Figura 14) representan el promedio + S.E de 2 experimentos individuales preformados por duplicado, lo que indica que CM10 no indujo la lisis de CDC en el entorno probado.

Experimento de eficacia in vivo

[0171] El objetivo de este experimento es evaluar el efecto directo de CM10 en células de melanoma in vivo, así como evaluar el efecto inmunomodulador, que falta en el entorno de xenoinjerto.

Calibración de experimentos de xenoinjerto

[0172] La línea humana positiva CEACAM1 de células de melanoma comprada de "ATCC" (SKMel5) y NOD-SCID, se utilizaron ratones emparejados por edad de "Harlan laboratories". El ensayo de calibración se realizó con el fin de controlar el crecimiento de los tumores y encontrar el régimen de TIL óptimo. Las células de melanoma SKMel5 se inyectaron SC (subcutáneamente) a ratones SCID-NOD y el volumen del tumor se controló mediante mediciones físicas. Cuando el volumen tumoral alcanzó los 100 mm³, los ratones se dividieron en 5 grupos aleatorizados. Los TIL se inyectaron IT (Intra Tumoral) en dos concentraciones diferentes o IV (Intra Venus) a una concentración (20X10⁶ por ratón), mientras que un grupo recibió una sola inyección y el segundo grupo recibió 2 inyecciones de TIL. Cada inyección de TIL fue seguida por 5 días de administración de hIL-2. El experimento de calibración

demostró que la inyección IV de TIL tiene un mayor efecto sobre el tamaño del tumor que la administración de TIL. Además, el régimen TIL repetitivo proporciona una mejor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con la inyección única, como podría predecirse a partir de la semivida de las células T. Sobre la base de estos datos, TIL se administrará cada 10 días mediante inyecciones IV, en futuros experimentos de xenoinjerto.

5

Actividad anti cáncer inmunomoduladora *In vivo* de CM10

[0173] Se inyectaron subcutáneamente células de melanoma humanas SKmel5 positivas para CEACAM1 a ratones SCID-NOD. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm³, los ratones fueron asignados al azar a uno de los siguientes grupos de tratamiento: a) Inyecciones IV semanales de PBS; b) Inyecciones intravenosas semanales de 0,45 mg de CM10; c) Tres inyecciones IV de 20x10⁶ células T humanas antitumorales (TIL) e inyecciones IV semanales de PBS; d) Tres inyecciones IV de 20x10⁶ células T humanas reactivas antitumorales e inyecciones IV semanales de 0,45 mg de CM10. Una persona ciega al entorno experimental midió el volumen de los tumores 2-3 veces por semana. Los resultados de la Figura 8 representan el volumen promedio del tumor \pm SE de 6-10 ratones por grupo. Las flechas indican el tiempo de administración (CM10 ciclo, triángulos TIL, CM10 y cuadrados abiertos TIL). Como se muestra, se observó una inhibición moderada del crecimiento tumoral con CM10 solo o con TIL solamente, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística en comparación con el tratamiento de control. Sorprendentemente, la combinación de transferencia de células T adoptivas humanas con inyecciones de CM10 exhibió sinergismo significativo e inhibió fuertemente el crecimiento del xenoinjerto. Esta observación concuerda con los datos *in vitro* que muestran el efecto potenciador de CM10 sobre la destrucción de células T (Figuras 5 y 6).

10

15

20

25

[0174] La inhibición significativa del crecimiento se observó en el grupo tratado con CM10 en presencia de TIL. Estos resultados refuerzan el efecto inmunoestimulador del mAb anti CEACAM1 en diferentes líneas celulares, e indican que CM10 puede usarse como anticuerpo inmunomodulador prometedor. Esta observación concuerda con los datos *in vitro* que muestran el efecto estimulante de CM 10 en eliminación de células de melanoma por células T.

Conclusiones

[0175] CEACAM1 se conoce como un regulador de la activación de linfocitos. CM10 es un anticuerpo que bloquea las interacciones entre dos moléculas de CEACAM1 (Figura 4) y, por lo tanto, elimina las señales inhibitoras mediadas por CEACAM1, da como resultado una activación de linfocitos citotóxicos más fuerte contra las células tumorales (Figuras 6 y 7). El resultado del xenoinjerto *in vivo* (Figura 8) refuerza la naturaleza inmunoestimuladora de CM10 y demuestra una inhibición significativa del crecimiento de tumores en ratones tratados con CM10 en presencia de TIL. El esquema presentado en la Figura 9 demuestra una teoría no limitativa del modo de acción de CM10 que previene la interacción CEACAM1-CEACAM1 permitiendo la activación de señales de muerte por células del sistema inmunitario.

35

40

Ejemplo 7: evaluación de seguridad *in vitro* CM10

Efecto de CM10 en células humanas normales

[0176] Para evadir el sistema inmune, las células cancerosas alteran la expresión de muchas moléculas. Varias evidencias han demostrado que la expresión de CEACAM1 se aumenta durante la transformación de malignidad de las células de melanoma. De acuerdo con la literatura, CEACAM1 también se expresa en células normales, por lo tanto, es importante mapear los posibles sitios de unión de CM10 en el cuerpo e identificar si la unión de CM10 a células normales puede conducir a un resultado no deseado.

45

50

Reactividad cruzada de los tejidos humanos normales

[0177] En este estudio, se examinó la intensidad de unión del mAb anti-CEACAM1 en una micromatriz de tejido humano que contenía muestras de melanoma normal y maligno. La intensidad de unión se evaluó usando un sistema estándar de puntuación patológica. Microarreglo tisular (TMA) que contiene 100 casos de melanoma maligno (primario, metástasis) y de nevos benignos se analizaron para la intensidad de unión a antiCEACAM1 mediante el procedimiento IHC estándar. Cada núcleo de tumor se clasificó de 0 a +3. Como se muestra en la Figura 10, la intensidad de unión del mAb anti-CEACAM1 se observó en más del 50% de las muestras de melanoma y en el 65% de las muestras de melanoma metastásico.

55

60

65

[0178] La micromatriz de tejido de órganos humanos (TMA) multi-normal incluía 33 tipos de órganos normales, cada tipo tomado de 3 individuos humanos normales. La edad varió de 2 a 67 años, 43 especímenes fueron derivados de mujeres y 57 especímenes de hombres. Los siguientes tejidos fueron negativos para unión mAb anti-CEACAM1: Cerebro, cerebelo, ovario, páncreas, glándula paratiroideas, hipófisis, glándula tiroideas, amígdala, médula ósea, bazo, timo, pulmón, músculo cardíaco, estómago, músculo esquelético, piel, nervios periféricos, mesotelio y retina. Se detectó una tinción específica de células en algunos órganos, principalmente en el lado luminal de las células epiteliales que forman conductos o glándulas en órganos viscerales huecos, tales como: borde en cepillo del intestino delgado; algunas glándulas apicales del colon; epitelio ductal mamario; canaliculi hepático biliar; superficie

interna de los túbulos renales; pocas glándulas endometriales, parte luminal de la glándula salival. Además, se observó cierta tinción celular baja en la corteza de la glándula suprarrenal, la superficie apical de las glándulas prostáticas, las células de Leidig de los testículos y las células individuales dispersas en el páncreas. Las únicas células del sistema inmune que dieron positivo fueron neutrófilos dentro de los capilares. No se encontró tinción de linfocitos en tejidos y órganos linfáticos. Finalmente, se encontró tinción positiva débil a moderada en células endoteliales de vasos sanguíneos pequeños en sitios selectivos, que incluyen: ovario, glándula suprarrenal, riñón y, raramente, en páncreas, próstata, hipófisis y endometrio.

[0179] El análisis IHC mostró una fuerte tinción contra CEACAM1 de células de melanoma, en comparación con la ausencia de tinción de la inmensa mayoría de los tejidos examinados en un tejido humano normal. Sin embargo, se observó cierta tinción selectiva en el aspecto luminal de las células epiteliales de los conductos o glándulas en las vísceras huecas. Este aspecto celular generalmente es menos accesible para un anticuerpo administrado a través de la sangre periférica.

15 Cuantificación de moléculas de CM10 unidas por célula

[0180] Para cuantificar el número exacto de moléculas de CM10 unidas a cada tipo de célula, se utilizó el kit QuantiBRITE. Usando el kit, la MFI (intensidad media de fluorescencia) se tradujo directamente al número de moléculas unidas por célula. Se adquirieron tres células primarias humanas de tejidos, que resultaron positivas para la unión anti-CEACAM1, de ATCC. Células HUVEC para representar la tinción positiva encontrada en las células endoteliales; células epiteliales de próstata primarias, ya que la superficie apical de las glándulas prostáticas mostró tinción positiva, y células epiteliales del túbulo proximal renal primario ya que la superficie interna de los túbulos se tiñó positivamente. En más detalles, se cultivaron células primarias SkMel 5, G361, Malme 3M, NK 92MI, HUVEC, renales y células primarias de próstata de acuerdo con los protocolos ATCC. CM10 se conjugó a una molécula de PE (RPE LYNX Rapid Conjugation Kits Serotec) según el protocolo del fabricante y se usó (1 µg/ml) con el kit de perlas QuantiBRITE PE (BD) para determinar el ABC (anticuerpos unidos por célula) mediante Citometría de flujo. El número de moléculas de CM10 unidas por célula se analizó usando citometría de flujo en las células primarias indicadas en comparación con las líneas celulares de melanoma. Al menos 10.000 células se contaron para cada línea celular.

[0181] El análisis cuantitativo (Figura 11, los resultados representan el promedio de 2-3 experimentos independientes \pm SE) mostró que las células de melanoma positivas para CEACAM1 se unen entre 20.000-50.000 moléculas de CM10, mientras que las células endoteliales y epiteliales normales (p. ej. HUVEC, renales y de próstata) que se han informado para ejercer alguna expresión de CEACAM1, se unen hasta 2.000 moléculas de CM10 solamente. Además, se unieron un gran número de anticuerpos CM10 a las células NK (~ 20.000) que se correlacionan con los datos publicados que muestran una alta expresión de CEACAM1 en linfocitos activados. Estos resultados refuerzan el perfil de seguridad de CM10 (baja expresión en las células primarias) y su actividad (resultados NK) como un jugador en la lisis celular mediada por linfocitos activados.

40 Proliferación de células primarias humanas en presencia de CM10

[0182] Dado que se encontró cierta tinción positiva en tejidos normales, se examinó el efecto de CM10 sobre el crecimiento celular primario. Células de HUVEC y de próstata primarias se cultivaron de acuerdo con los protocolos ATCC y se controlaron para determinar la proliferación celular usando el ensayo estándar XTT. No se pudo detectar ningún efecto sobre la proliferación celular.

Resumen

[0183] Se identificó el perfil de unión de mAAb anti CEACAM1 a los tejidos normales y células de melanomas. CEACAM1 es la ausencia en los melanocitos normales, pero se somete a neoexpresión y se expresa ampliamente en la gran mayoría de las muestras de melanoma metastásico (Figura 10), en otro órgano normal hay expresión restringida de CEACAM1 en células específicas dentro de varios tejidos. Un análisis cuantitativo, que mide el número de moléculas CM10 que están unidas a las células, reveló un número muy bajo de CM10 unida en células primarias humanas normales (Figura 11). Estos resultados implican que la mayor parte de las moléculas de CM10 inyectadas a los pacientes se dirigirán principalmente a las células cancerosas y no a los tejidos normales debido a las diferencias de expresión. Además, CM10 no tiene ningún efecto sobre la proliferación celular, la actividad de CDC, y la actividad de ADCC despreciable o baja que sugiere que la unión de CM10 a células no diana, no daría como resultado un resultado celular no deseado.

60 El efecto de CM10 en el sistema inmune

[0184] CM10 es un anticuerpo inmunostimulador que bloquea la interacción entre dos moléculas de CEACAM1 y al hacerlo media la estimulación de linfocitos contra células malignas. Es importante verificar que el anticuerpo no provoque una estimulación desencadenada del sistema inmune que pueda causar eventos adversos graves. En los linfocitos normales hay una expresión de abandono de CEACAM1 en la membrana celular, solo después de la activación celular, CEACAM1 se moviliza a la membrana, donde se regula rápida y fuertemente en los linfocitos

activados (Gray-Owen y Blumberg 2006, Nat Rev Immunol 6, 433-46). Como se demostró anteriormente, no se observó reactividad cruzada con los tejidos linfáticos normales (bazo, timo, médula ósea) ni con los linfocitos; sin embargo, se realizaron diversos análisis de inmunotoxicidad *in vitro* y *ex vivo* para ayudar a predecir los posibles efectos secundarios.

5

El efecto de CM10 en la proliferación de linfocitos humanos

[0185] Una de las formas más comunes y aceptables para evaluar la seguridad de los anticuerpos inmunomoduladores *in vitro* consiste en examinar sus efectos en la proliferación y la secreción de citoquinas de PBMC humanas normales (células mononucleares de sangre periférica). Se aislaron PBMC humanas de 3 donantes no relacionados y se incubaron con CM10 usando 3 concentraciones diferentes (2 µg/ml, 20 µg/ml o 200 µg/ml) o con un mAb de control IgG1K (200 µg/ml) durante 60 minutos y con ocho pozos replicados. Se añadió PHA (1 µg/ml) a 4 de los pocillos replicados de ensayo y las células se incubaron durante 96 horas. La incorporación de 3H-timidina se utilizó para ensayar la proliferación celular. Las células estimuladas simuladamente y las células estimuladas solo con PHA se usaron como controles negativo y positivo del ensayo, respectivamente. La proliferación se evaluó en linfocitos en reposo así como en linfocitos activados (tratados con PHA). Las células estimuladas simuladamente y las células estimuladas solo con PHA se usaron como controles negativo y positivo del ensayo, respectivamente. Los resultados (Figura 12) muestran claramente que CM10 no tiene ningún efecto sobre la proliferación de linfocitos humanos vírgenes o activados. Además del estudio de proliferación de PBMC, se evalúa el efecto de CM10 en la secreción de citoquinas de PBMC humanas. Los estudios de secreción de citoquinas definen el efecto inmunomodulador de CM10 y ayudan a predecir los posibles efectos secundarios.

10

15

20

Ejemplo 8. Panel de selectividad CM10.

[0186] La caracterización del perfil de unión se realizó usando líneas celulares que sobreexpresan las diferentes proteínas de la familia CEACAM y análisis de citometría de flujo. En humanos, la familia CEA está codificada por 18 genes y 11 pseudogenes en el cromosoma 19q13.2. Varios miembros estrechamente relacionados pertenecen a la familia CEACAM (CEACAM1, 3, 4, 5, 6, 7, 8) y se expresan diferencialmente por diversos tipos de células humanas. Las proteínas CEACAM se han implicado en diversos efectos mediados por la adhesión que rigen el crecimiento y la diferenciación de células normales y cancerosas (Gray-Owen y Blumberg 2006, Nat Rev Immunol 6, 433-46). Las proteínas estrechamente relacionadas en la familia comparten una alta similitud de aminoácidos que varía desde un 45% hasta un 90% de similitud entre ciertos miembros.

25

30

[0187] Un protocolo estándar FACS se utilizó con CM10 conjugado con una molécula de biotina y avidina Strep-APC como agente secundario. 721,221 células que expresan CEACAM 1,5,6,8 o HEK 293 T transitoria que expresa CEACAM 3, 4, se tiñeron con CM10 biotinilado (1 µg/ml) y Strep-avidina APC como agente secundario. Los histogramas vacíos representan la tinción de mAb mientras que los histogramas rojos representan la tinción de fondo. Se usaron al menos 10.000 células para analizar la unión de CM10 en cada histograma. El FAB se calculó dividiendo la MFI de las células teñidas en la MFI de la tinción de fondo. Los resultados demostrados en la Figura 13 indican claramente que CM10 se une fuertemente a las células que expresan CEACAM1. Se observó tinción moderada en células que expresan CEACAM3 y 5. Se demostró unión débil o negligente en células que expresan CEACAM 4, 6, 8.

35

40

Conclusiones

[0188] CM10 es un mAb desarrollado para reconocer CEACAM1 humano, una proteína que se encontró que estaba asociada con el cáncer, en general, y con Melanoma en particular. La sobreexpresión de CEACAM1 se ha identificado en algunas enfermedades malignas, entre ellas melanoma, NSCLC, cáncer de tiroides y cáncer gástrico. La evidencia indica que la sobreexpresión de CEACAM1 puede correlacionarse con un mal pronóstico en pacientes con melanoma y CPCNP. Se ha encontrado que CEACAM5 está sobreexpresado en un alto porcentaje de muchos tumores humanos, incluido el 90% de los cánceres gastrointestinales, colorrectales (CRC) y pancreáticos, el 70% de las células de cáncer de pulmón no microcítico y el 50% de los cánceres de mama. También se sobreexpresa en cánceres de tiroides, estómago, ovario y útero (Thompson, Grunert et al., 1991, J Clin Lab Anal 5, 344-66). CEACAM5 incluso sirve como un marcador clínico para la metástasis hepática en CCR y la vigilancia posquirúrgica del cáncer de colon (Duffy 2001, Clin Chem 47, 624-30). La evidencia de que CM10 es capaz de unirse a CEACA5 es muy importante y puede ampliar las posibles indicaciones que pueden ser tratadas por CM10 de 4 a 5 tipos de tumores malignos por encima de 10. Los agentes anti-CEACAM5 que han ingresado en ensayos clínicos incluyen anticuerpos anti-CEACAM5 conjugados a sustancias tóxicas tales como sustancias radiactivas para ambos propósitos de diagnóstico y para el tratamiento de diversas malignidades. Parece que incluso estas formas conjugadas tóxicas no muestran problemas de seguridad, lo que puede indicar que CEACAM5 es un objetivo seguro (Liersch, et al., 2005, J Clin Oncol 23 (27), 6763-70; Ychou, et al., 2008, Clin Cancer Res 14 (11), 3487 - 93). Por otro lado, ninguno de estos agentes se dirige a la regulación inmunológica de los tumores, que puede ser dirigida por un anticuerpo que puede unir tanto a CEACAM1 como a CEACAM5, como CM10.

45

50

55

60

65

Ejemplo 9: Mapeo de epítopes de CM10

[0189] Para reconstruir epítomos discontinuos de la molécula diana, se sintetizó una biblioteca de péptidos estructurados. La molécula diana era el dominio N de la molécula de CEACAM1 humana que tiene la secuencia:

5 1 QLTTESMPFN VAEGKEVLLL VHNLPQQLEFG YSWYKGERVD GNRQIVGYAI50
 51 GTQQATPGPA NSGRETIYPN ASLLIQNVTQ NDTGFYTLQV IKSDLVNEEA100
 101 TGQFHVYPL08 (SEQ ID NO:35).

10 **[0190]** La biblioteca se sintetizó usando tecnología de Pepscan's Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS) que permite estructurar péptidos en bucles individuales, bucles dobles, bucles triples, pliegues en forma de hoja, pliegues en forma de hélice y combinaciones de los mismos (Timmerman et al 2007, J. Mol. Recognit. 20: 283 - 99 y Sloodstra et al. 1996, Molecular Diversity 1: 87 - 96). Los moldes de CLIPS están acoplados a residuos de cisteína. Las cadenas laterales de múltiples cisteínas en los péptidos están acopladas a uno o dos moldes CLIPS. Por ejemplo, se disuelve una solución 0,5 mM del molde T1 CLIPS 1,3-bis (bromometilo) benceno en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,9)/acetoneitrilo (1:1 (v/v)). Esta solución se agrega a las matrices de péptidos. El molde CLIPS se unirá a las cadenas laterales de dos cisteínas presentes en los péptidos unidos a la fase sólida de las matrices peptídicas (placa de 455 pocillos con pocillos de 3 µl). Las matrices de péptidos se agitan suavemente en la solución durante 30 a 60 minutos mientras que están completamente cubiertas en solución. Finalmente, las matrices peptídicas se lavan extensamente con exceso de H₂O y se sonicen en tampón disruptivo que contiene 1 por ciento de SDS/0,1 por ciento de beta mercaptoetanol en PBS (pH 7,2) a 70°C durante 30 minutos, seguido por sonicación en H₂O durante otros 45 minutos. Los T3 CLIPS que llevan péptidos se realizaron de una manera similar pero con tres cisteínas.

25 **[0191]** Se sintetizó un total de 3.002 péptidos que incluye: un conjunto de matriz CLIPS que combina dos áreas diferentes de la proteína completa, en las que las cisteínas nativas se sustituyen por alaninas; Conjuntos de péptidos lineales de longitud 6,10,15,20,25 y 33; Conjuntos de péptidos lineales de longitud 15, donde el residuo medio se reemplaza por alanina; Conjunto de bucle conformacional CLIPS de longitud 15 en el que las cisteínas nativas están reemplazadas por alaninas; y el conjunto de bucle conformacional CLIPS de longitud 15 con el residuo medio reemplazado por alanina en el que las cisteínas nativas se reemplazan por alaninas.

35 **[0192]** La unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos sintetizados se ensayó en un ELISA basado en PEPSCAN. Las matrices de péptidos se incubaron con solución de anticuerpo primario (CM10) (durante la noche a 4°C). Después del lavado, las matrices de péptidos se incubaron con una dilución 1/1000 de un conjugado de peroxidasa de anticuerpo durante una hora a 25°C. Después del lavado, el sustrato de peroxidasa de sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y se añadieron 2 microlitros/mililitro de 3 por ciento H₂O₂. Después de una hora, se midió el desarrollo del color. El desarrollo del color se cuantificó con un dispositivo de carga acoplada (CCD) - cámara y un sistema de procesamiento de imágenes.

40 **[0193]** Los valores obtenidos de la cámara CCD van de 0 a 3000 mAU, similar a un lector ELISA de placa de 96 pocillos estándar. Los resultados se cuantifican y se almacenan en la base de datos Peplab. Los valores de enlace se extraen para el análisis utilizando una representación gráfica de los datos donde los valores tomados por una variable en un mapa bidimensional se representan como colores.

45 **[0194]** En base a los patrones de unión observados, el núcleo del epítomo de CM10.S91 consiste en residuos ¹⁷VLLLVHNLPPQLF₂₉. Se observó una región de unión secundaria en la secuencia alrededor de ⁶⁸YPNASLLIQNVT₇₉. Cuando los patrones de unión observados se comparan con la estructura de cristalina disponible de la proteína diana, se propone que el epítomo discontinuo para CM10.S91 consiste en ¹⁷VLLLVHNLPPQLF₂₉ (núcleo) junto con ⁶⁸PNASLLI₇₅ (soporte).

Ejemplo 10: Experimentos adicionales que evalúan la actividad de CM10

Secreción de Granzima B por células efectoras como marcador potencial de PD

55 **[0195]** El desarrollo de marcadores farmacodinámicos (PD) robustos es fundamental para mejorar el éxito de los fármacos en los ensayos clínicos y ayuda en la selección de una dosis óptima de drogas para equilibrar eficacia y la toxicidad. Los marcadores de PD a menudo son proximales en una ruta molecular al objetivo del fármaco y se usan para medir el efecto de un fármaco independientemente del efecto terapéutico. La Granzima B es una proteasa de serina que se libera a través de gránulos citoplasmáticos de células T citotóxicas (CTL) y células NK al reconocer objetivos específicos. Esto, a su vez, media la apoptosis de las células diana. Intentamos determinar si CM10 potencia la secreción de granzima B a partir de células NK y T efectoras en presencia de células diana específicas, permitiendo de este modo la destrucción mejorada observada de las células diana por el anticuerpo.

65 **[0196]** Se incubaron TIL con CM10 (0,2 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml o 10 µg/ml) o un control control de isotipo coincidente (IPI-Ipilimumab 10 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C; se añadieron células de melanoma positivo diana

que expresan CEACAM1 y HLA-A2-SKMEL5, para una incubación durante la noche a una relación de efector a objetivo de 2,5:1. La secreción de Granzima B se midió por ELISA. Los resultados representan la media de \pm SE de los valores de liberación de granzima B a partir de 6 repeticiones por tratamiento. Se vieron resultados similares en otro experimento independiente.

[0197] A representado en la Fig. 15 TIL secreta bajos niveles iniciales de granzima B que permanecen bajos en presencia de CM10 solo. Solo cuando las células diana se agregaron a la TIL, la granzima B se elevó dramáticamente. Sin embargo, CM10 fue capaz de aumentar significativamente la secreción de granzima B por encima de los altos niveles iniciales. Se observaron resultados similares cuando se usaron células NK92MI como células efectoras que demuestran que CM10 puede potenciar la secreción de granzima B de las células NK de una manera similar. El uso de Granzima B como marcador de PD para el tratamiento con CM10 también se examina en un conjunto complementario de experimentos que incluyen modelos in vivo y muestras de pacientes.

CM10 bloquea las interacciones CEACAM1-CEACAM5

[0198] Se ha encontrado que el antígeno carcinoembrionario (CEA, CEACAM5, y CD66e) se asocia con varios tipos de cánceres, carcinoma particularmente colorrectal, así como gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cánceres de mama, tiroides, estómago y cáncer de ovario. La molécula se ha desarrollado para ser un objetivo para el diagnóstico y la terapia del cáncer.

[0199] Las interacciones homófilas de CEACAM1 entre una línea celular de melanoma deficiente en MHC-I y células NK inhibieron significativamente la destrucción de las células cancerosas por las células NK (Markel et al. J. Immunol., 2002; 168: 2803-2810). De manera similar, la expresión forzada de CEACAM5 en células 721.221 defectuosas de clase I HLA también suprimió la citotoxicidad mediada por NK (Stern et al J Immunol. 2005; 174: 6692-6701), lo que indica que las interacciones heterófilas CEACAM5-CEACAM1 también pueden desencadenar la señalización inhibitoria de CEACAM1 en las células inmunes.

[0200] La línea celular positiva CEACAM1 (SKMel 5) se incubó con un control de isotipo o CM10 en diversas concentraciones, CM10 no unido se lavó dos veces, seguido de incubación con o sin CEACAM5 biotinilado soluble. La unión del CEACAM5 biotinilado a las células se detectó mediante un análisis secundario de estreptavidina-APC y FACS. Los resultados representan la media de los pocillos duplicados \pm SE. Se obtuvieron resultados similares en otros dos experimentos independientes.

[0201] Los resultados de la figura 16 demuestran que CM10 inhibe la unión entre CEACAM1 a CEACAM5 de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto CM10 se puede utilizar para tratar tumores malignos que expresan altos niveles de CEACAM5 y explotan el eje de CEACAM1-CEACAM5 con el fin de suprimir la células inmunes.

CM10 potencia la eliminación de células T restringidas por HLA

[0202] Las células T citotóxicas destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Estas células reconocen sus objetivos uniéndose a antígenos asociados con moléculas de HLA, que están presentes en la superficie de casi todas las células del cuerpo. La muerte de células infectadas o malignas requiere el reclutamiento de varias vías para generar una respuesta adecuada.

[0203] Se buscó este conjunto de ensayos para determinar si CM10 aumenta la actividad CTL "natural", que es HLA restringido o, alternativamente, produce una estimulación general del sistema inmune.

[0204] TIL se incubaron con CM10 (0,2 μ g/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml o 10 μ g/ml) o un isotipo de anticuerpo de control durante 30 minutos a 37°C. Las células de melanoma objetivo SKMEL5, que expresan CEACAM1 y HLA-A2, se preincubaron con o sin anticuerpo monoclonal bloqueante HLA-A2 durante 1 hora y se añadieron para una incubación durante la noche a una relación efector a objetivo de 2,5:1. La muerte se determinó mediante un ensayo de liberación de LDH estándar. Los resultados representan la media de \pm SE de valores de liberación de LDH a partir de 3 repeticiones por tratamiento.

[0205] Los resultados en la Fig 17 demuestran que en presencia de anticuerpos que bloquean HLA-A2, CM10 fue incapaz de aumentar la destrucción de células de melanoma por la TIL y que la actividad de CM10 está restringida para HLA. Se observó un resultado similar en otro experimento independiente. Por lo tanto, se sugiere que, de acuerdo con estos resultados, CM10 mejorará la actividad de los CTL contra las células malignas in vivo y no facilitará la activación inespecífica del sistema inmune.

La actividad inmunomoduladora de CM10 inhibe el crecimiento tumoral in vivo

[0206] Uno de los modelos más utilizados para evaluar la acción in vivo de agentes nuevos contra el cáncer es el modelo de xenoinjerto de tumor humano. En este modelo, las células tumorales humanas se trasplantan bajo la piel en ratones inmunocomprometidos que no rechazan las células humanas. Dependiendo de la cantidad de células inyectadas y la tasa de crecimiento de las células, el tumor se desarrolla durante varias semanas, y la respuesta a

los regímenes terapéuticos apropiados puede estudiarse in vivo. La ventaja de un modelo que involucra el tratamiento en etapas tempranas de la formación del tumor es la oportunidad de examinar la influencia del agente en un entorno que puede ser más similar a la diseminación de metástasis en pacientes e identificar el efecto del tratamiento sobre la implantación tumoral inicial.

5 **[0207]** La actividad inmunomoduladora de CM10 in vivo se examinó por lo tanto en ratones SCID-NOD injertados con células de melanoma humano bajo un régimen de tratamiento profiláctico. Se distribuyeron aleatoriamente ratones SCID-NOD de acuerdo con los cinco grupos de tratamiento indicados en la figura 18. 6×10^6 Células SKmel5 (línea celular de melanoma) se inyectaron en el día 0. Los ratones se trataron con anticuerpos/TIL como se indica en la figura. Las flechas indican el tiempo de administración; las flechas delgadas representan anticuerpos-0,25mg/ratón/inyección (CM10, control de IgG y control de Ipilimumab) y flechas anchas para TIL (20×10^6 células por ratón por inyección). El volumen de los tumores se midió a ciegas 2-3 veces por semana. Los resultados representan volúmenes tumorales medios de \pm SE de 8-9 ratones por grupo.

15 **[0208]** La Fig. 18 muestra que la combinación de transferencia de células T adoptivas humanas con inyecciones de CM10 exhibió sinergismo significativo e inhibió fuertemente el crecimiento de xenoinjertos en comparación con el grupo de control de isotipo (69% de TGI). Los resultados demuestran que CM10 también tiene un efecto como agente único (TGI 45% en el día 32) y probablemente trabajó directamente sobre las células tumorales o el entorno de los tumores al inhibir la proliferación, la angiogénesis o a través de otras vías biológicas.

20 **[0209]** En el mismo conjunto de experimentos, se determinó el peso total de los tumores en el día de finalización del experimento. Los resultados obtenidos apoyan las mediciones de volumen y muestran una disminución dramática en la carga tumoral del grupo tratado con TIL + CM10 y también una reducción estadísticamente significativa en el peso de los tumores en el grupo tratado con CM10.

25 **CM10 mejora la actividad de muerte inmunomoduladora de células NK en líneas celulares de cáncer de páncreas CEACAM1-positivas**

30 **[0210]** El cribado preliminar mostró que las líneas celulares de cáncer de páncreas y las muestras de pacientes expresan altos niveles de CEACAM1 (94% a partir de muestras de cáncer de páncreas era positivo para CEACAM1). Por lo tanto, se realizó un experimento para examinar si CM10 puede potenciar la actividad de las células inmunitarias contra las líneas celulares de cáncer de páncreas. Los ensayos de destrucción se llevaron a cabo mediante cocultivo de células NK92MI que se pretrataron con diversas concentraciones de CM10 con diferentes líneas celulares de cáncer de páncreas objetivo CEACAM1. NK 92MI se incubaron con CM10 (0,2 μ g/ml, 1 μ g/ml o 10 μ g/ml) o un control de isotipo coincidente (10 μ g/ml) durante 30 minutos a 37°C; **A.** Las células diana que expresan CEACAM1 se añadieron durante 5 horas adicionales a una relación efector a objetivo de 2,5:1 (COLO-357) o durante la noche a una relación de efector a objetivo de 5:1 (BXPC3). Los resultados representan un promedio de % de citotoxicidad \pm SE como se determina mediante el ensayo de liberación de LDH clásica de pocillos por triplicado por tratamiento.

40 **[0211]** Los resultados representados en la figura 19 muestran que, aunque la muerte de las células de cáncer de páncreas por las células NK fue relativamente baja, CM10 reforzó esta actividad por hasta 2 pliegues de la citotoxicidad de línea de base (PBS o control Ab). Se vieron resultados similares en dos líneas adicionales.

45 **CM10 mejora la secreción de granzima B de células NK en presencia de líneas celulares de cáncer de páncreas positivas para CEACAM1**

50 **[0212]** El experimento se diseñó para determinar, de manera similar a las células de melanoma, CM10 puede mejorar la secreción de la granzima B a partir de células NK en presencia de células de cáncer pancreático. En un entorno similar al ensayo de destrucción, las células NK se pretrataron con diversas concentraciones de CM10 y luego se cocultivaron con cuatro líneas celulares de cáncer de páncreas diana diferentes. Los sobrenadantes se analizaron para determinar el contenido de granzima B mediante un ELISA específico. NK 92MI se incubaron con CM10 (0,2 μ g/ml, 1 μ g/ml o 10 μ g/ml) o un anticuerpo de control de isotipo coincidente (10 μ g/ml) durante 30 minutos a 37°C. Las células pancreáticas diana que expresan CEACAM1 se añadieron durante 5 horas adicionales en una relación efector a objetivo de 2,5:1 de **A.** (COLO-357 y ASPC-1) y **B.** (SU8686) o **E:** T de 10: 1 **C.** (BXPC3). La secreción de Granzima B se midió por ELISA. Los resultados representan la media de \pm SE de los valores de liberación de granzima B de 2-6 repeticiones por tratamiento.

60 **[0213]** La Figura 20 demuestra claramente que CM10 aumenta la secreción de granzima B a partir de células NK en presencia de células de cáncer de páncreas.

Ejemplo 11: Anticuerpos humanizados y humanos

65 **[0214]** Un anticuerpo humanizado típicamente tiene un marco humano injertado con CDR no humanas. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado tiene una o más secuencias de aminoácidos introducidas en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que

típicamente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar 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 por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0215] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utilizarán para producir anticuerpos humanizados, es muy importante para reducir la antigenicidad de acuerdo con el método denominado "mejor ajuste", la selección de la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que está más cerca de la del roedor se acepta entonces como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296, 1993; Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901, 1987). Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89: 4285, 1992; Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623, 1993).

[0216] Es más importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse del receptor e importar secuencias de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

[0217] Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90: 2551, 1993; Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258, 1993; Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33, 1993, y Duchosal et al., *Nature* 355: 258, 1992. Los anticuerpos humanos también pueden derivarse de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597, 1991; Vaughan et al., *Nature Biotech* 14: 309, 1996).

Ejemplo 12. Fragmentos de anticuerpos

[0218] Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117, 1992 y Brennan et al., *Science*, 229: 81, 1985). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden ser producidos directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167, 1992). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la técnica. Alternativamente, el anticuerpo de elección puede ser un fragmento Fv de cadena simple (scFv).

Ejemplo 13. La potencia de anticuerpo anti CEACAM contra las infecciones virales

[0219] Los siguientes experimentos se usan para determinar el potencial de CM10 contra la infección viral. Los experimentos incluyen diferentes células diana, varios virus y varios modelos in vivo e in vitro.

Detección/diagnóstico: examen del nivel de expresión de CEACAM en líneas celulares y células primarias infectadas con diferentes tipos de virus, mediante análisis FACS, RT PCR e inmunohistoquímica.

Prevención: preincubación de las células diana con anticuerpo anti CEACAM y determinación de la carga viral o replicación viral después de la infección viral.

Tratamiento: después de la infección viral, las células infectadas se incuban con células del sistema inmune y se examina la capacidad de matar de las células efectoras y la carga viral. Además, la carga viral y la replicación y la supervivencia global se determinan in vivo después de la infección del virus y el tratamiento con anticuerpos anti CEACAM.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[0220]**

<110> Tel Hashomer Medical Research Infrastructure and Services Ltd
CCAM BIOTHERAPEUTICS LTD.

15 <120> ANTICUERPOS A MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR RELACIONADA A ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNICO (CEACAM)

20 <130> CCAM 004 PCT-1

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

25 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X es ausente o Thr

35 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X es ausente o Ile

40 <400> 1

Xaa Asn Asn Leu Xaa
1 5

45

<210> 2

<211> 8

50 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

55

Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr
1 5

60 <210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

65 <400> 3

ES 2 661 488 T3

5 Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
10 <213> Mus musculus

<400> 4

15 Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
1 5

<210> 5
20 <211> 4
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

25 Tyr Thr Ser Arg
1

30 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <400> 6

40 Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro
1 5

45 <210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

50 Asn Asn Leu Ile Glu
1 5

55 <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

60 <400> 8

65 Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

ES 2 661 488 T3

<210> 9
<211> 11
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9
10
Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr

15 1 5 10

<210> 10
<211> 11
20 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
25 Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

30 <210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
35 <400> 11

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5
40

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Mus musculus

<400> 12
50 Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro
1 5

<210> 13
55 <211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13
60
Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Asn Leu
1 5
65
<210> 14

ES 2 661 488 T3

<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

5 <400> 14

Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr
1 5

10

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 15

<400> 15

20

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr
1 5 10

25

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

30 <400> 16

30

35

Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
1 5

40

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus musculus

45 <400> 17

50

Tyr Thr Ser Arg
1

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

55 <400> 18

<400> 18

60

Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro Arg Thr
1 5

65

<210> 19
<211> 10
<212> PRT

ES 2 661 488 T3

<213> Mus musculus

<400> 19

5 Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Asn Leu Ile Glu
1 5 10

10 <210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 20

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

20 Gly

<210> 21
<211> 13
25 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

30

35

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

45 <400> 22

50 Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 23
<211> 7
55 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 23

60 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

65 <210> 24
<211> 9
<212> PRT

ES 2 661 488 T3

<213> Mus musculus

<400> 24

5 Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro Arg Thr
1 5

10 <210> 25
<211> 467
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> ADN recombinante

<400> 25

20 atgggatgga ccttggctct tctctttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt tcactoccag 60
gtccagctgc agcagtctgg agctgagctg gtaaggcctg ggacttcagt gaaggtgtcc 120
25 tgcaaggctt ctggatacgc cttcactaat aacttgatag agtgggtaaa acagaggcct 180
ggacagggcc ttgagtggat tggagtgatt aatcctggaa gtggtgatac taactacaat 240

30

35 gagaagttca agggcaaggc aacctgact gcagacaaat cctccaacac tgcctacatg 300
cagctcagca gcctgacatc tgatgactct gcggtctatt tctgtgcaag aggggattac 360
40 tacggtggct ttgctgtgga ctactggggc caaggaacct cagtcaccgt ctctcagcc 420
aaaacgacac ccccatccgt ttatcccttg gccctggaa gcttggg 467

45 <210> 26
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido recombinante

50 <400> 26

ES 2 661 488 T3

5 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Asn
20 25 30

10 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

15 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

20 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

25 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

30 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
 <211> 488
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN recombinante

40 <400> 27

50 atggtgtcct cagctcagtt ccttgggtctc ctgttgctct gttttcaagg aaccagatgt 60
 gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 120

55 atcagttgca ggacaagtca ggacattggc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 180
 gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 240

60 aggttcagtg gcagtggttc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 300
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaaaagcc ttcctcggac gttcgggtgga 360
 ggcaccaagt tggaaatcaa acgggtgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420

65 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccagaga 488

ES 2 661 488 T3

5 <210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido recombinante

<400> 28

15 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

20 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30

25 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

30 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

40 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro Arg
 85 90 95

45 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

45 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido recombinante

<400> 29

55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
 1 5 10

60 <210> 30
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Polipéptido recombinante

ES 2 661 488 T3

<400> 30

5 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

10 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Asn
20 25 30

15 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

20 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

25 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

30 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

35 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

40 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

45 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

50 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

55 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

60 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

65

ES 2 661 488 T3

5 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

10 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

15 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

20 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

25 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

30 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

35 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

40 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

45 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

50 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

55 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

60 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

65 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

70 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

75 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

80 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

ES 2 661 488 T3

Gly Lys
450

5

<210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Polipéptido recombinante

15 <400> 31

20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

25 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
20 25 30

30 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

35 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

40 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

45 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro Arg
85 90 95

50 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

55 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

60 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

65 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

70 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

75 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

80

ES 2 661 488 T3

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 5
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 10 <210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 32
 Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe
 1 5 10
 20
 <210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 30 Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr
 1 5 10
 35 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 34
 Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile
 1 5
 45 <210> 35
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 35
 Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15
 55 Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
 20 25 30
 60 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
 35 40 45
 65 Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
 50 55 60

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo que reconoce CEACAM1 humano que tiene:

5 una CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 o una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13, una CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8 o una secuencia establecida en SEQ ID NO: 14, una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9 o una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15, una CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10 o una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 16, una
10 CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 11 o una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 17, y una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12 o una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18.

15 2. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo:

(i) comprende CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8 y CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9;
20 (ii) comprende CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13, CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14 y CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15;
(iii) comprende CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10, CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 11 y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12;
25 (iv) comprende CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 16, CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 17, y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18;
(v) tiene secuencias de CDR expuestas en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17 y 18;
30 (vi) tiene secuencias de CDR expuestas en las SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11 y 12;
(vii) comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26, o un análogo que tiene al menos 97% de identidad de secuencia con dicha secuencia de dominio variable de cadena pesada;
35 (viii) comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 28, o un análogo que tiene al menos 97% de identidad de secuencia con dicha secuencia de dominio variable de cadena ligera;
(ix) comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26 y un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 28, o un análogo que tiene al menos 97% de identidad de secuencia con la secuencia de anticuerpo o fragmento; o
40 (x) comprende una secuencia marco seleccionada del grupo que consiste en: IgG2a de ratón, IgG2b de ratón, IgG3 de ratón, IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana; y las CDR que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17 y 18; o las CDR que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11 y 12; y análogos de los mismos que tienen al menos un 97% de identidad de secuencia con dichas secuencias de CDR, en donde el anticuerpo o fragmento monoclonal se une con una afinidad de al menos aproximadamente $5 \times 10^{-7} \text{M}$ a al menos dos subtipos de CEACAM
45 (xi) comprende una secuencia de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 30, o un análogo de la misma que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de cadena pesada del anticuerpo; o
(xii) comprende una secuencia de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 31, o un análogo de la misma que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de cadena ligera del anticuerpo; o
50 (xiii) comprende una secuencia de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 30, y secuencia de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 31, o un análogo de la misma que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de dichas secuencias.

55 3. Un anticuerpo monoclonal que reconoce CEACAM1 producido a partir de secuencias de ADN de las cadenas pesadas y ligeras contenidas en un plásmido depositado el 28 de septiembre de 2011 bajo el número de acceso ATCC PTA-12130.

60 4. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5. Un plásmido que comprende al menos una secuencia de polinucleótidos aislada de acuerdo con la reivindicación 4, preferiblemente el plásmido depositado el 28 de septiembre de 2011 bajo el número de acceso ATCC PTA-12130.

65 6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y un transportador farmacéuticamente

aceptable.

- 5 **7.** La composición farmacéutica de la reivindicación 6, para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, activación o función de CEACAM1, CEACAM3 o CEACAM5, preferiblemente en la que la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno proliferativo celular, más preferiblemente en el que enfermedad o trastorno proliferativo celular es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer gastrointestinal, colorrectal (CRC), pancreático, pulmón de células no pequeñas (NSCL), mama, tiroides, estómago, ovario, útero, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón y mieloma
- 10 **8.** Una composición de diagnóstico que comprende al menos un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y un transportador o excipiente opcional.
- 15 **9.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para uso en la prevención, atenuación o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, activación o función de CEACAM1.
- 10.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la enfermedad es cáncer.
- 11.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para uso en inmunomodulación; o para uso en la inhibición de la migración de una célula tumoral que expresa CEACAM; o para uso en la inhibición de la interacción proteína-proteína homotípica o heterotípica de CEACAM; o para uso en el aumento de la duración o progresión de la respuesta o supervivencia de un sujeto que tiene cáncer.
- 20 **12.** Un diagnóstico de metástasis de un cáncer en uno de estos, consiste en la comparación de una muestra biológica derivada del sujeto con la composición de diagnóstico de la reivindicación 8, en la que una formación de complejo más allá de un umbral predeterminado es indicativa del cáncer en el sujeto.
- 25 **13.** Un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CEACAM, que comprende los pasos de:
- 30 (i) incubar una muestra biológica con un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
- (ii) detectar el CEACAM unido usando una sonda detectable;
- 35 (iii) comparar la cantidad de (ii) con una curva estándar obtenida a partir de muestras de referencia que contienen cantidades conocidas de CEACAM;
- (iv) calcular la cantidad de CEACAM en la muestra biológica a partir de la curva estándar; y
- (v) comparar la cantidad de (iv) a una cantidad normal de CEACAM.

40

45

50

55

60

65

Figura 1

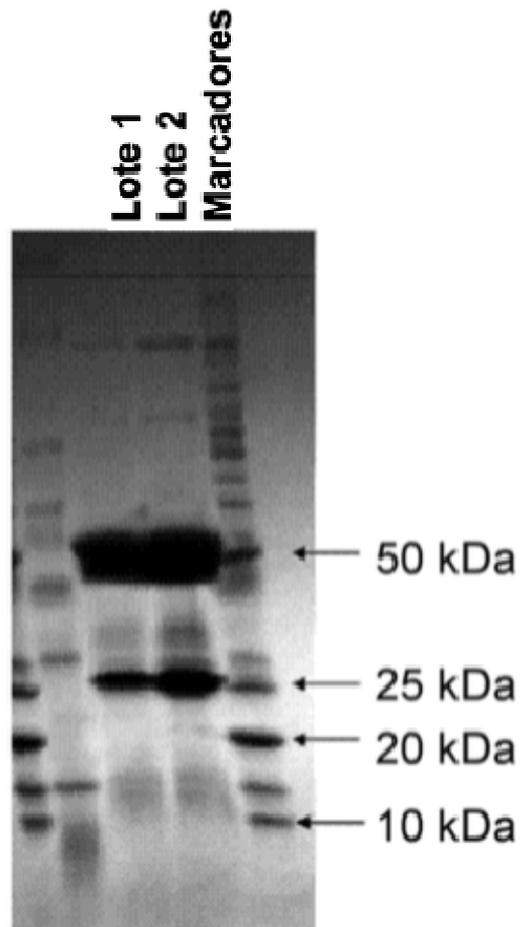


Figura 2

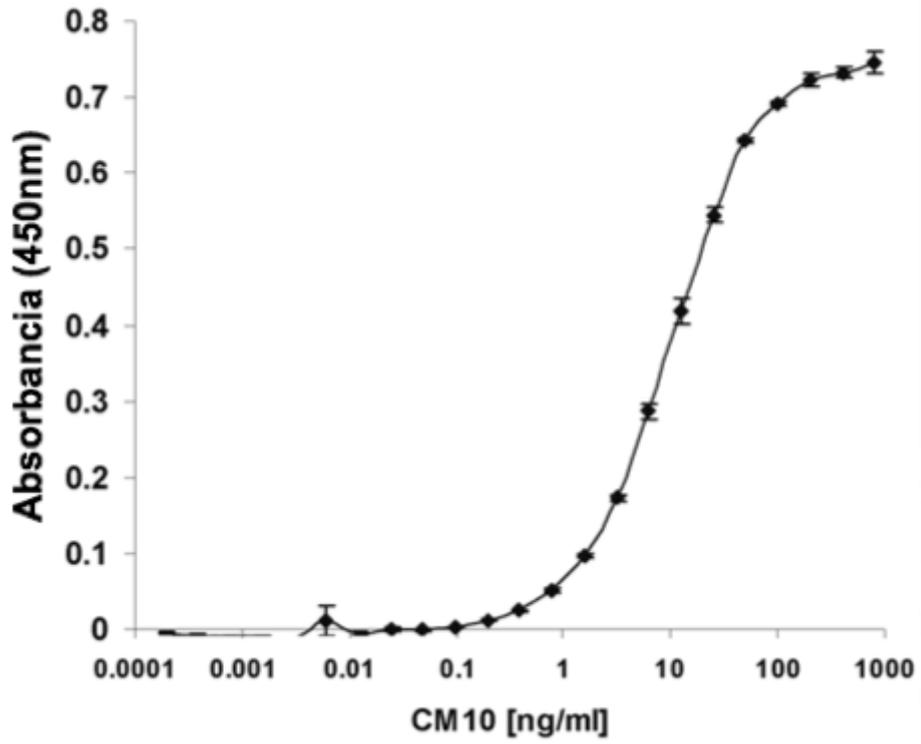


Figura 3

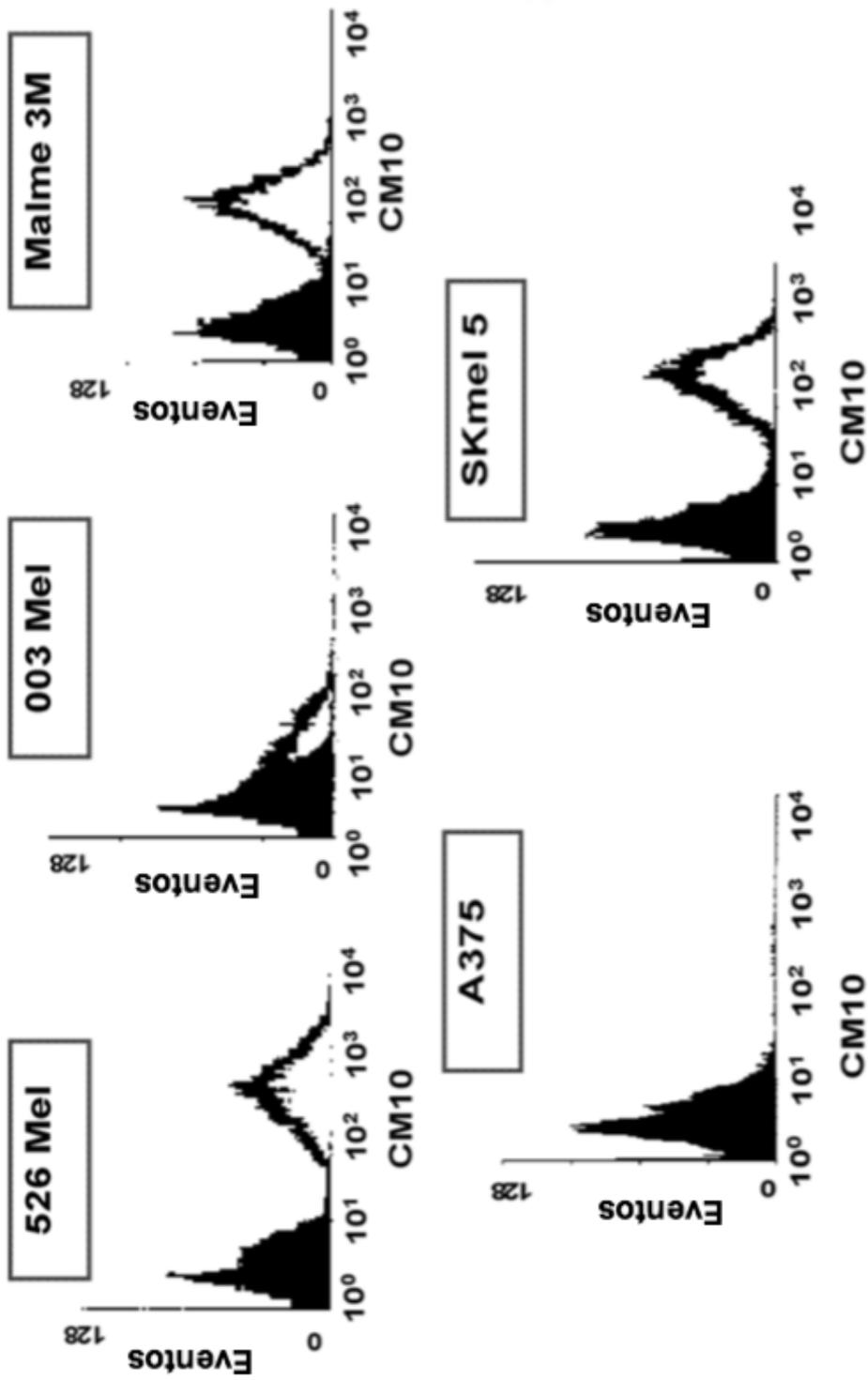


Figura 4

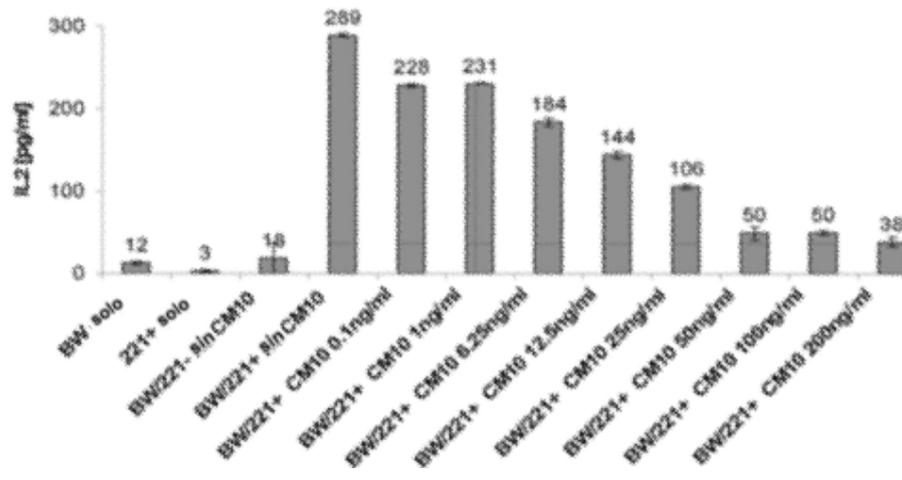


Figura 5

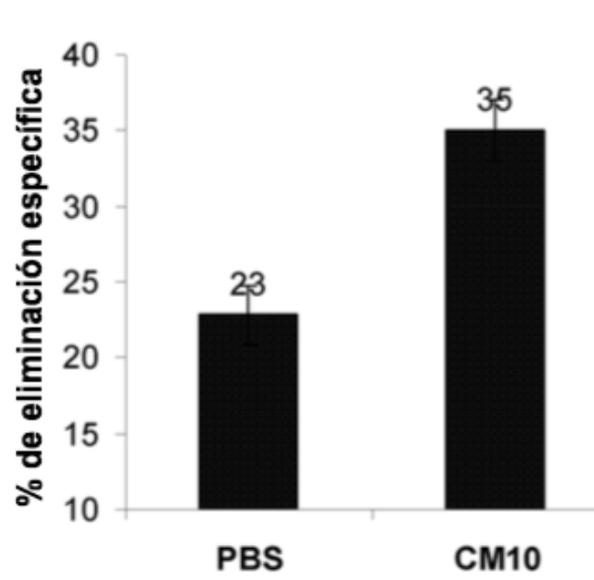


Figura 6

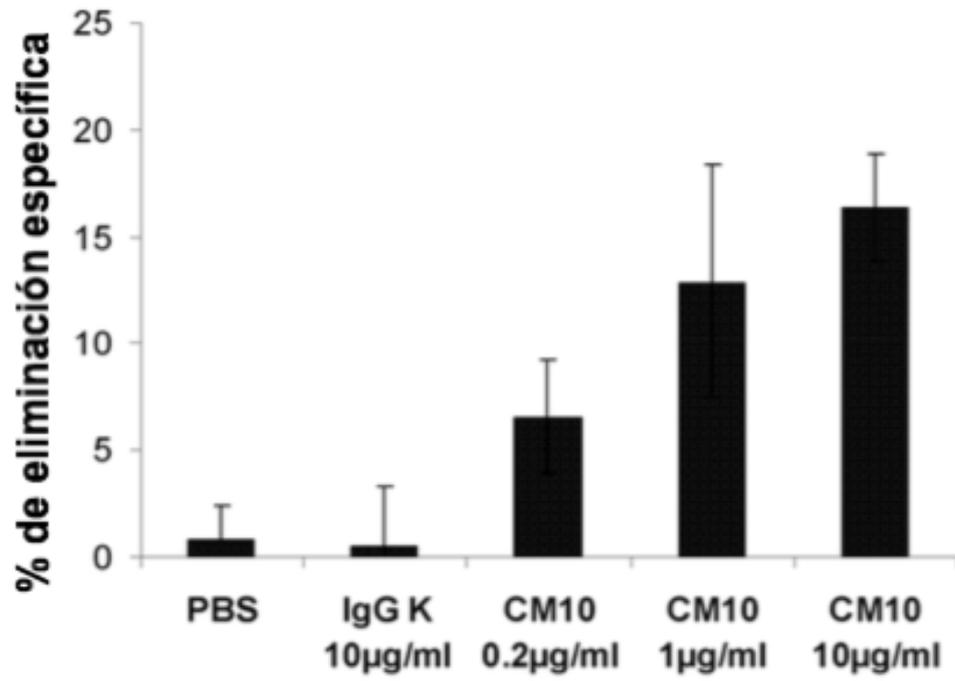


Figura 7

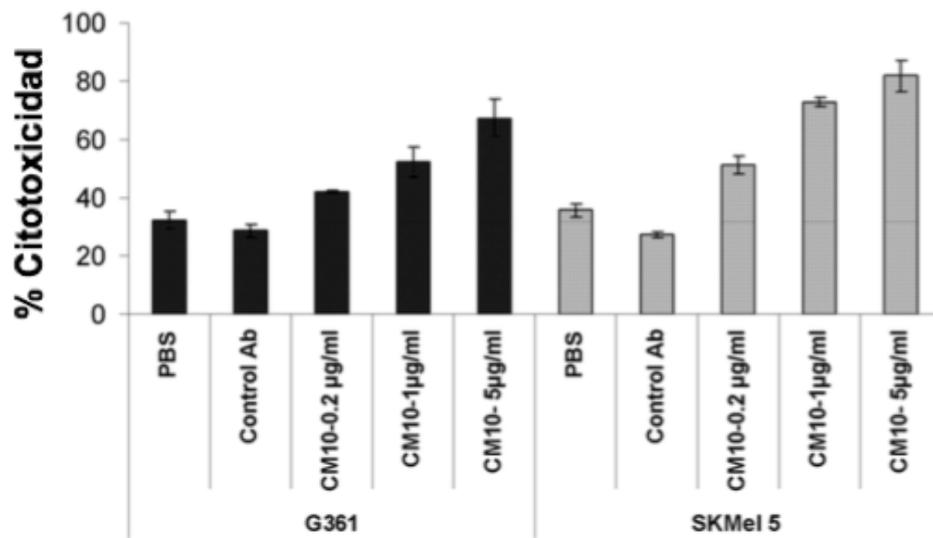


Figura 8

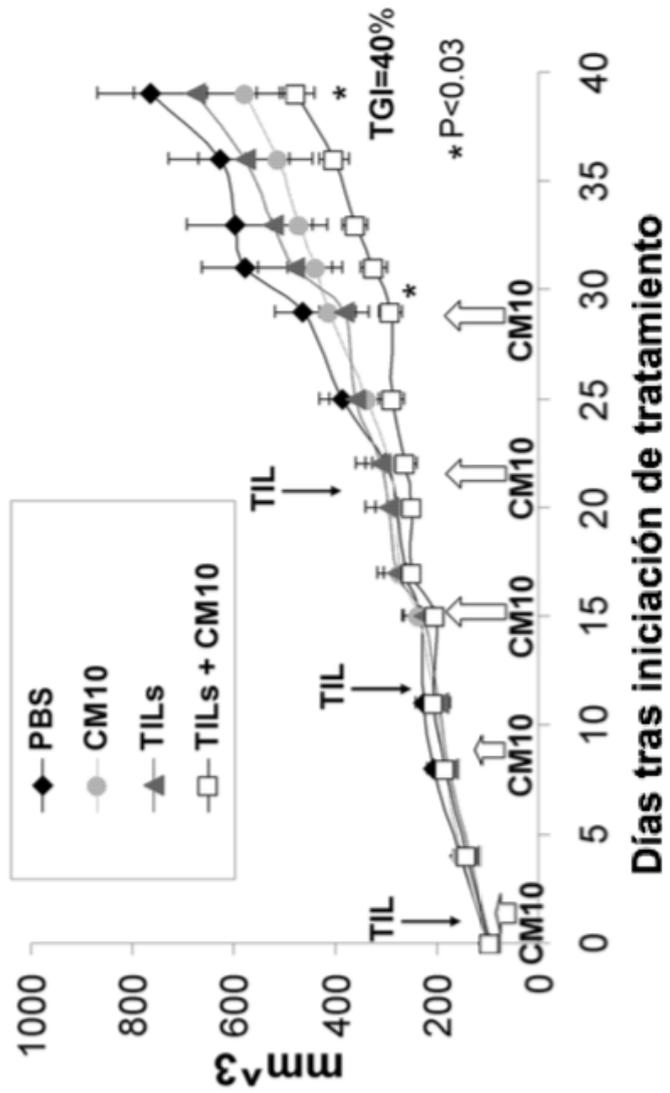


Figura 9

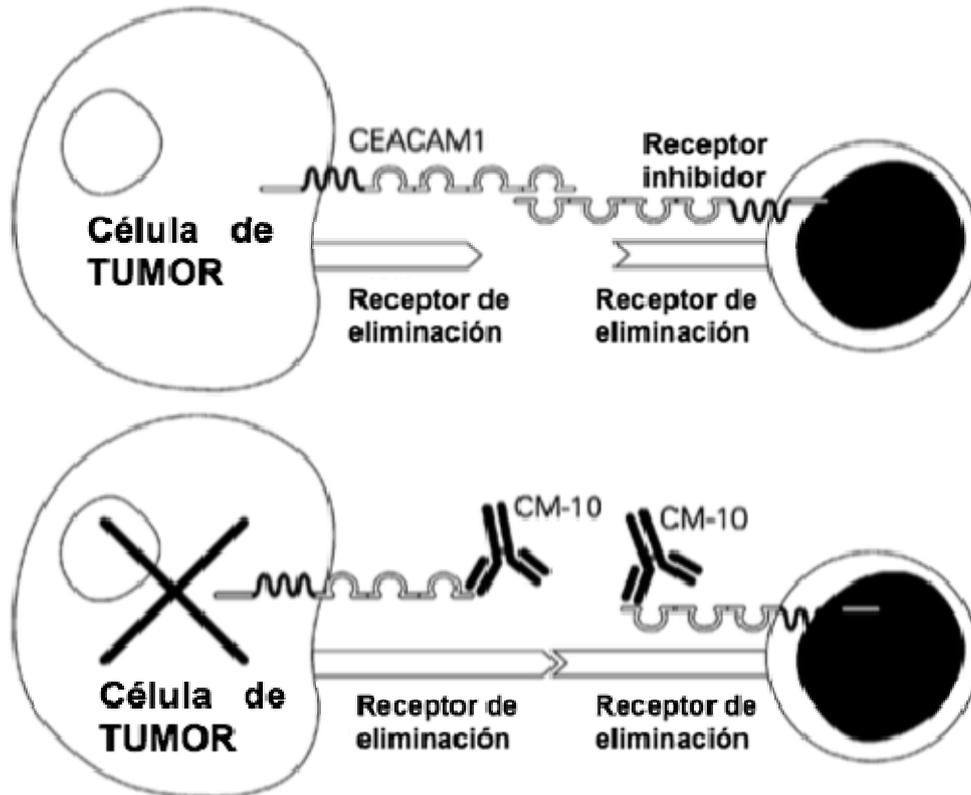


Figura 10

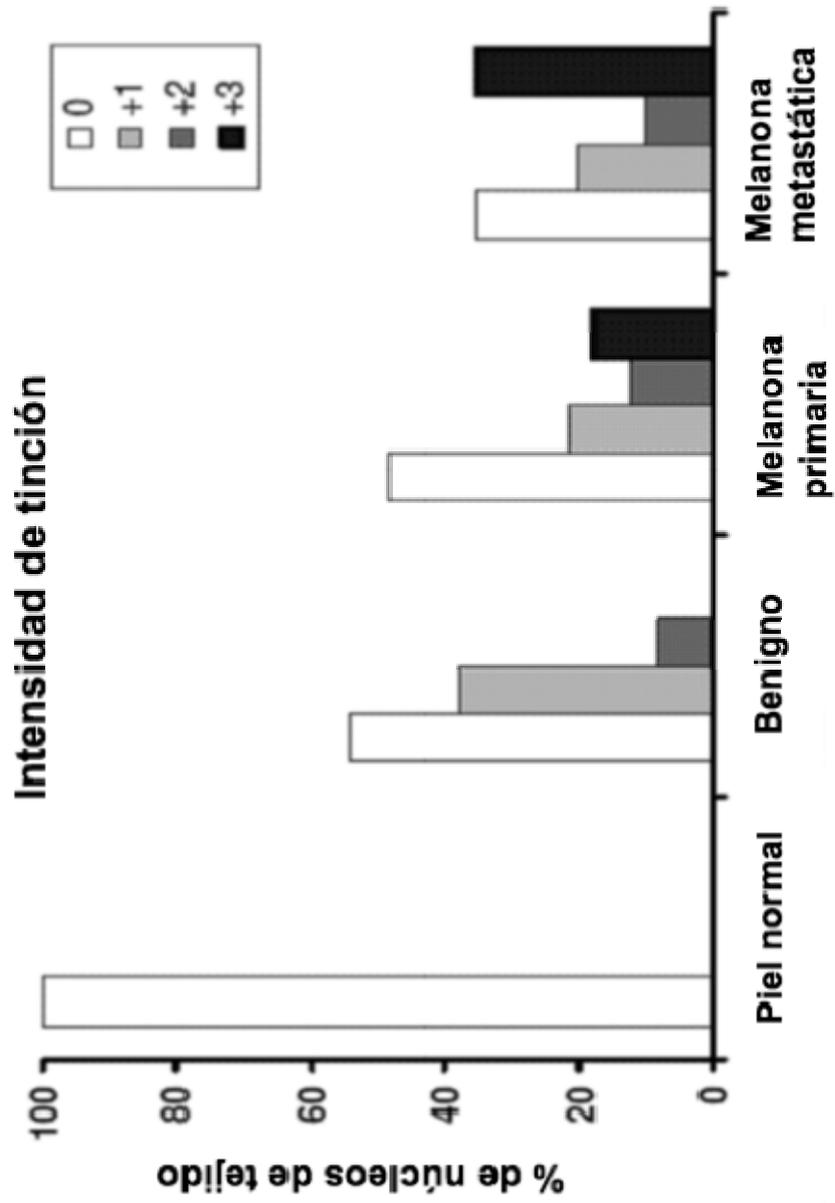


Figura 11

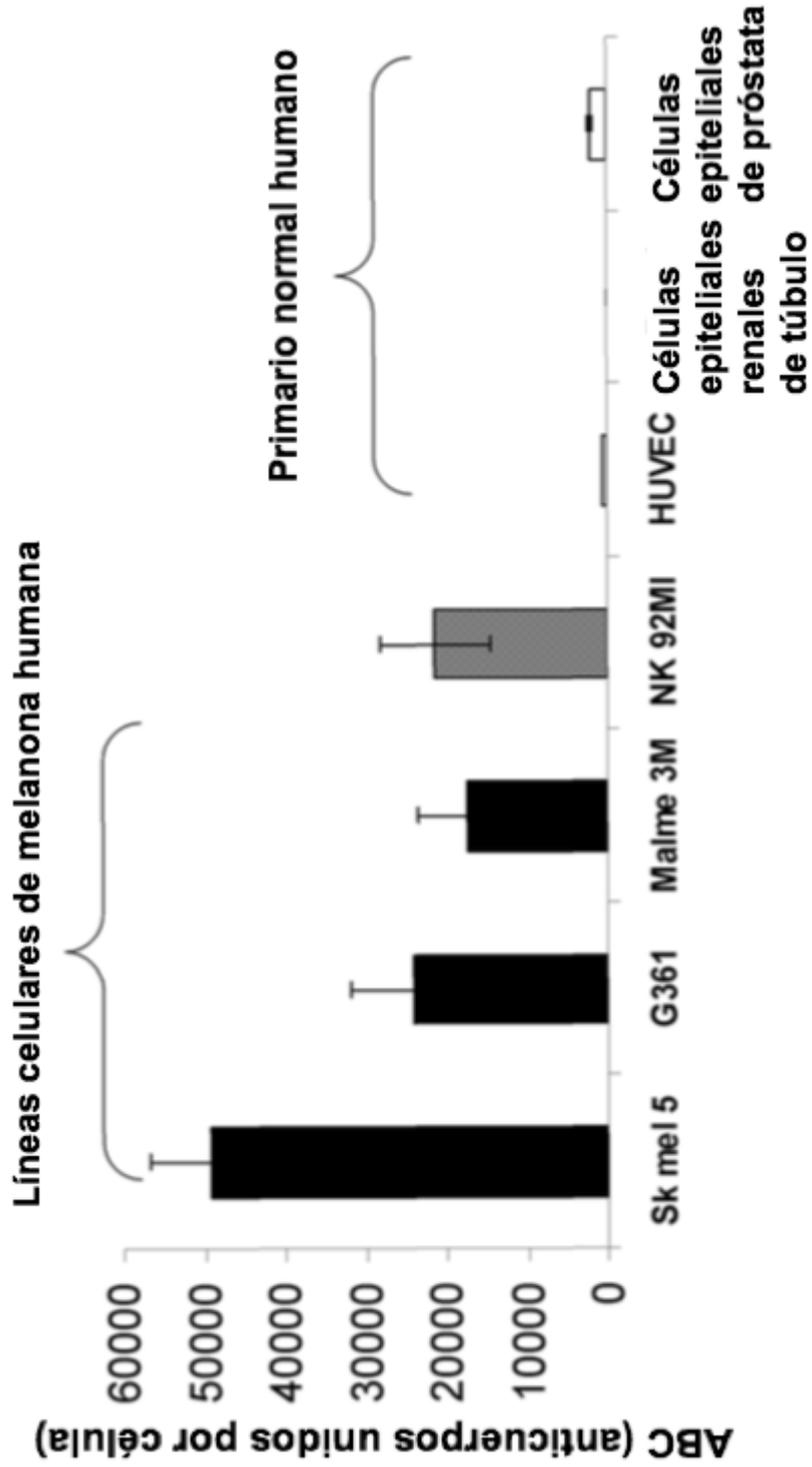


Figura 12

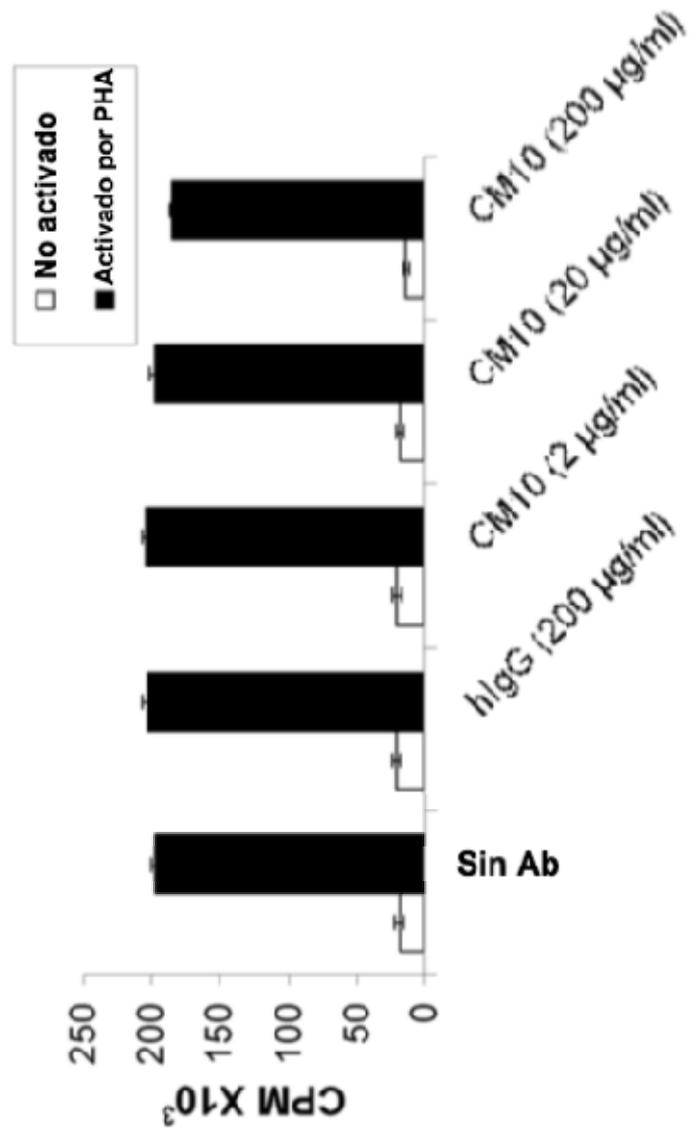


Figura 13

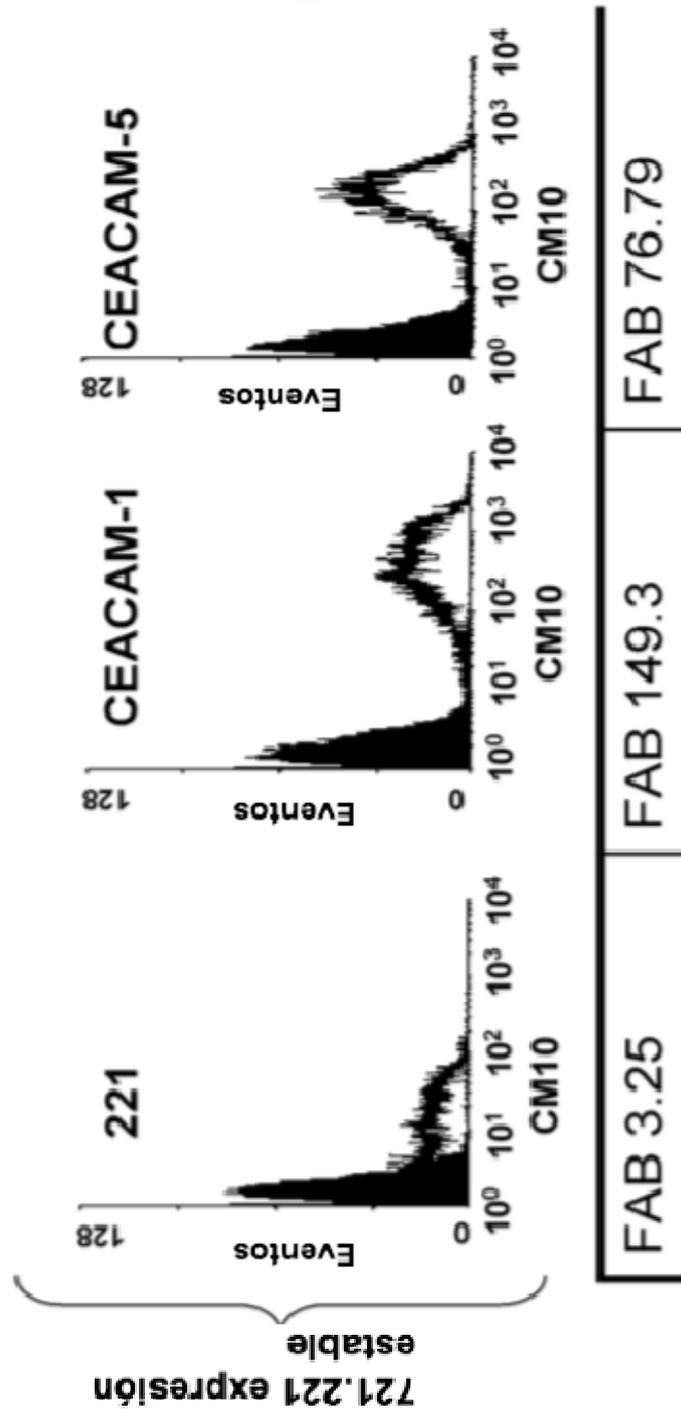


Figura 13 (cont.)

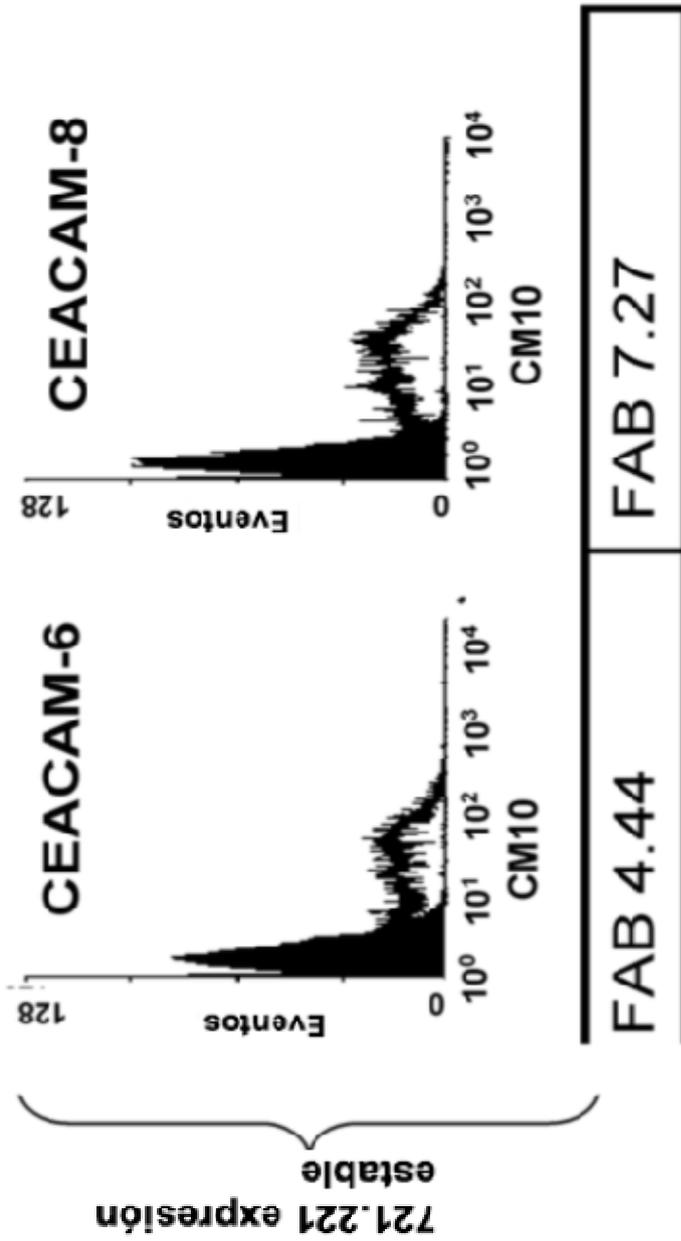


Figura 13 (cont.)

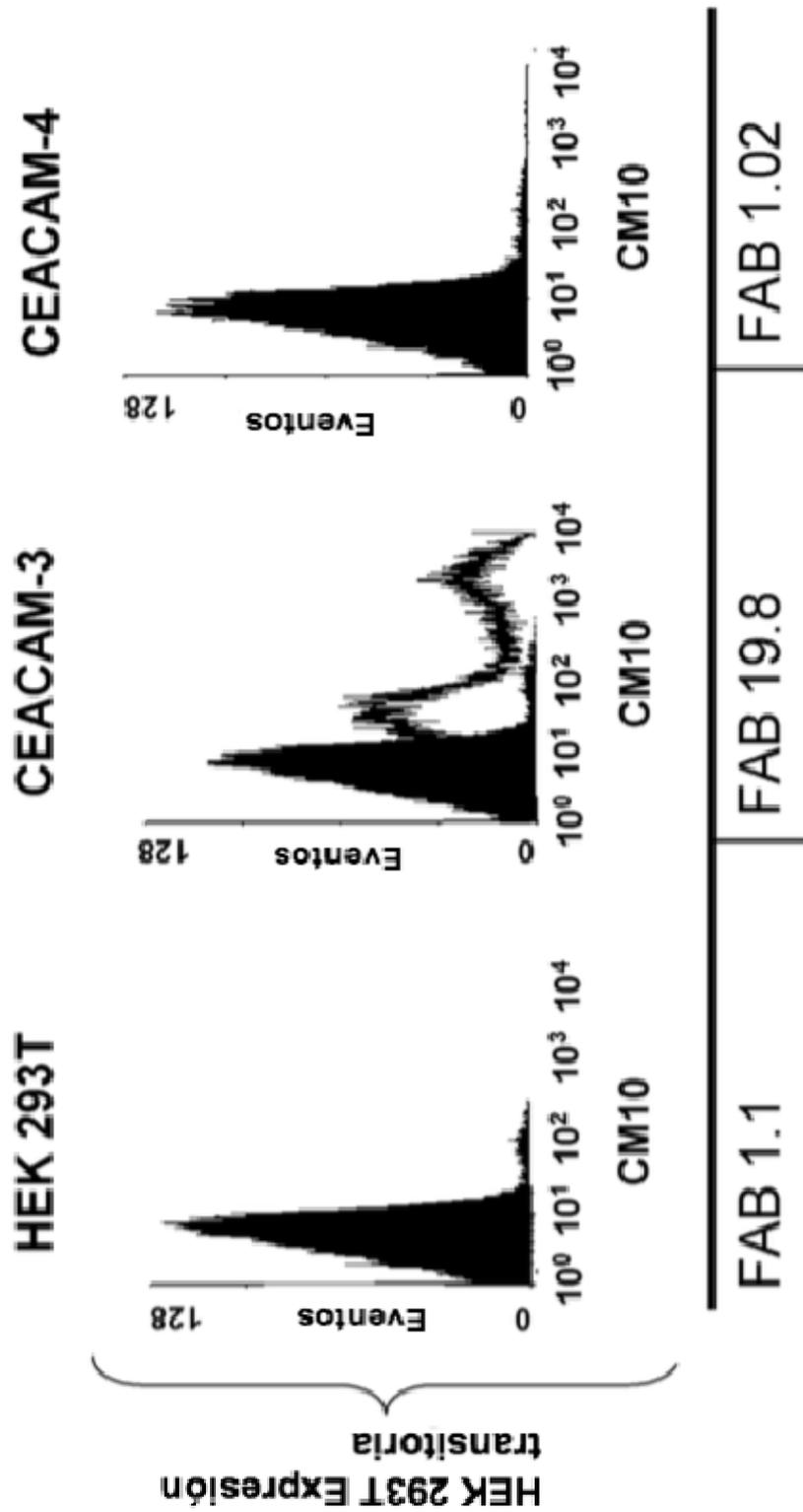


Figura 14

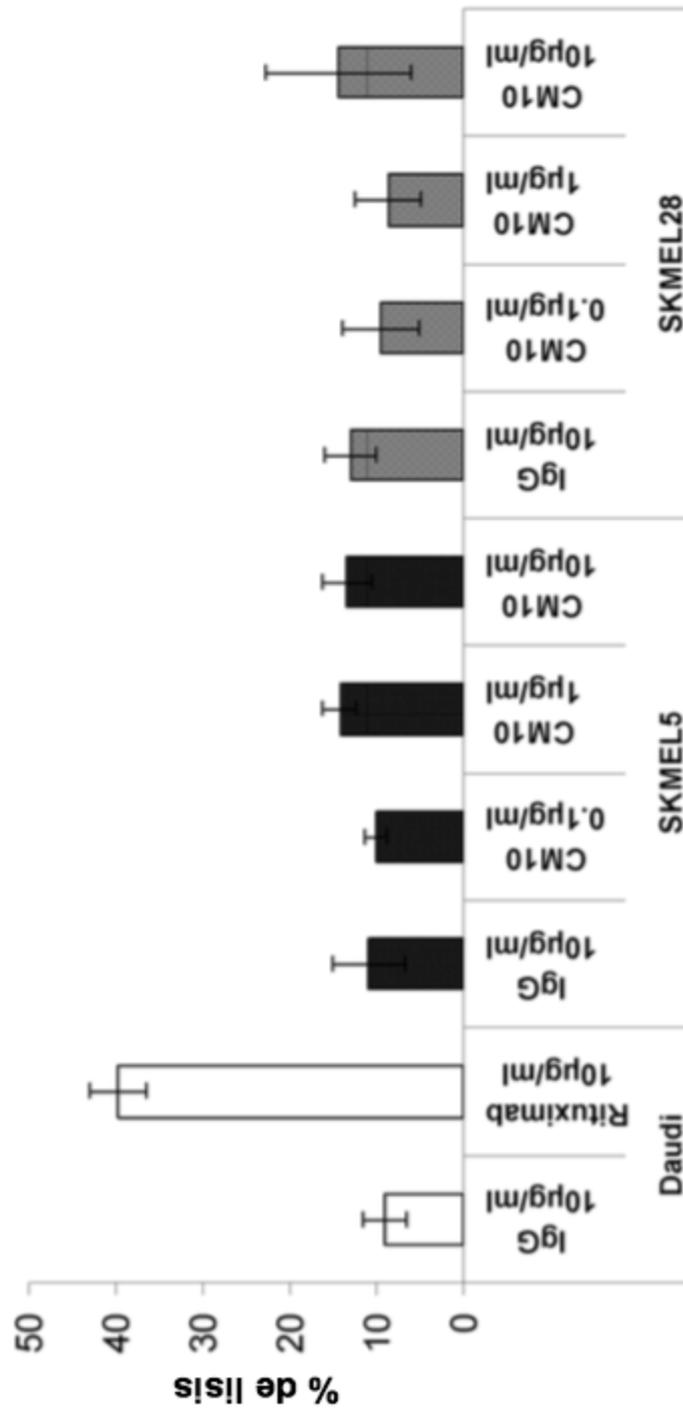


Figura 15

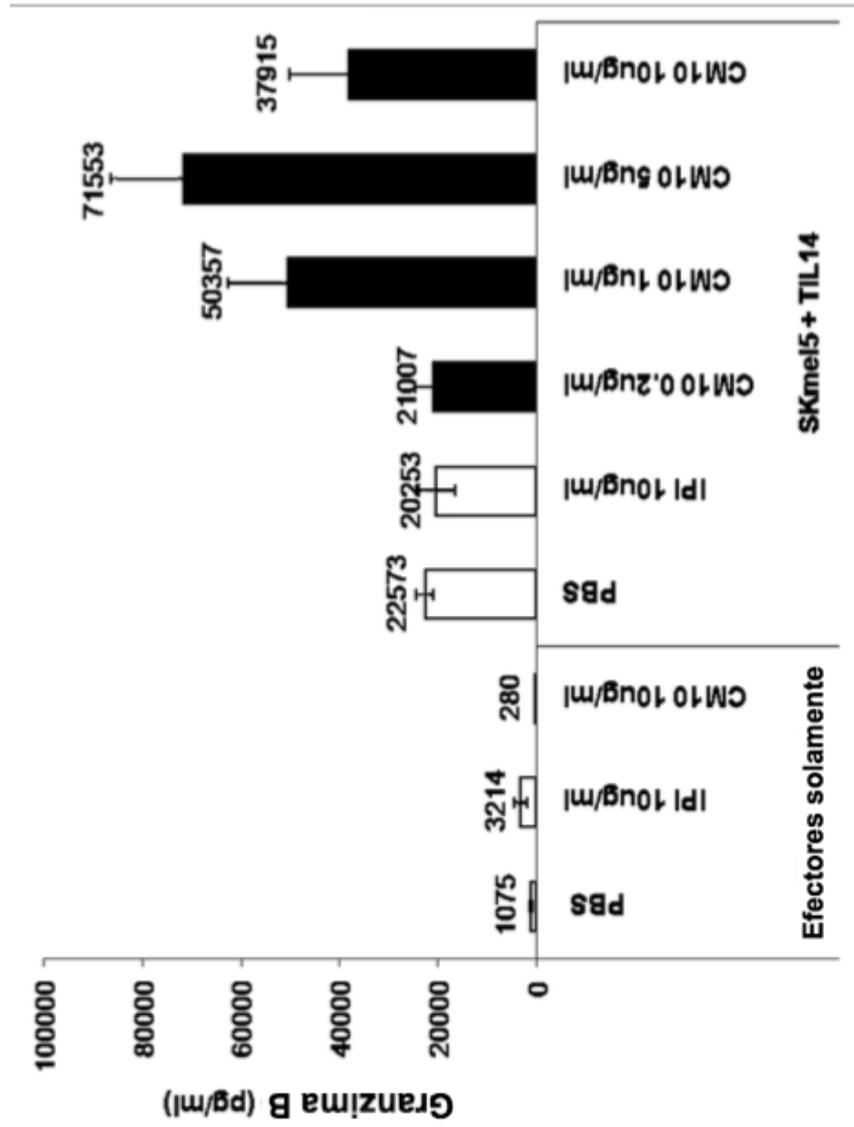


Figura 16

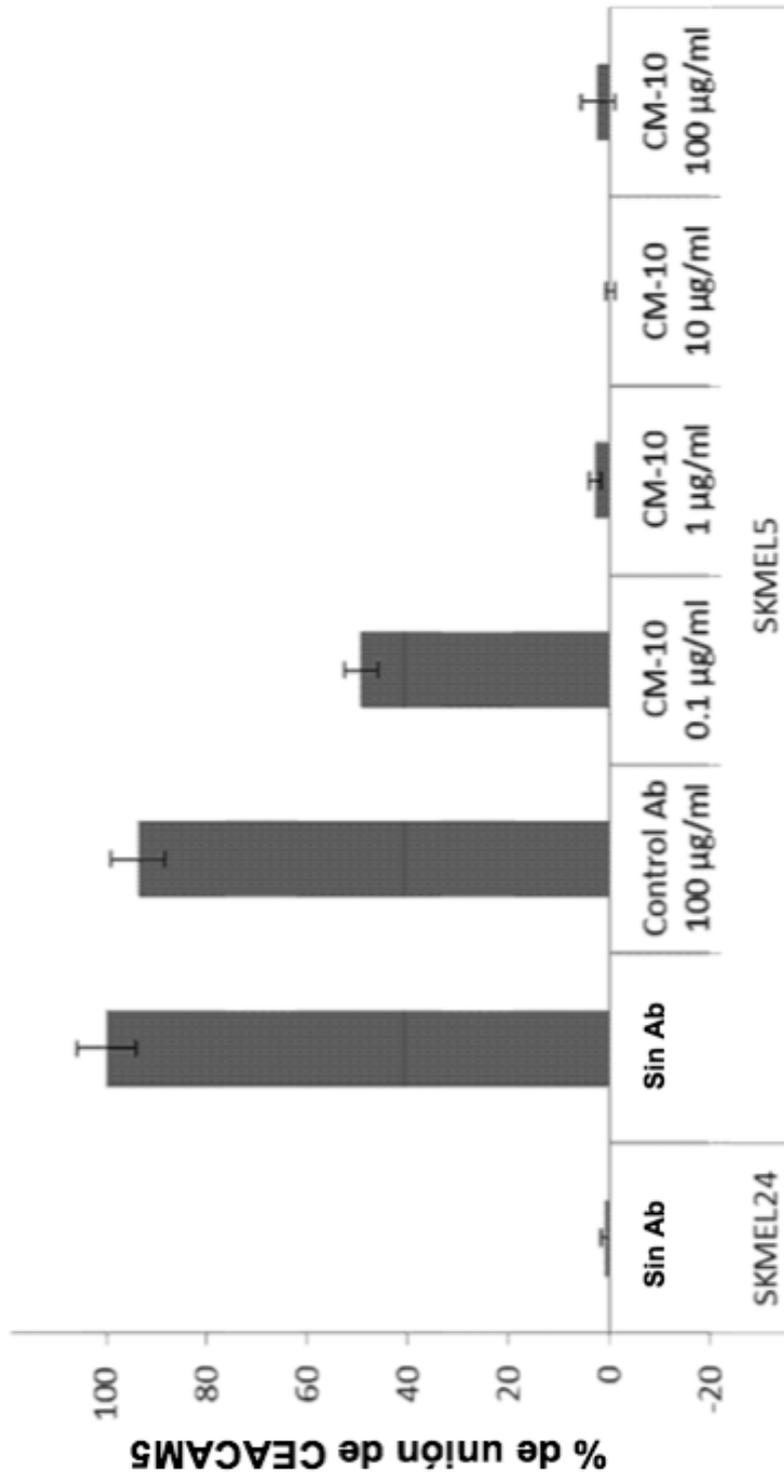


Figura 17

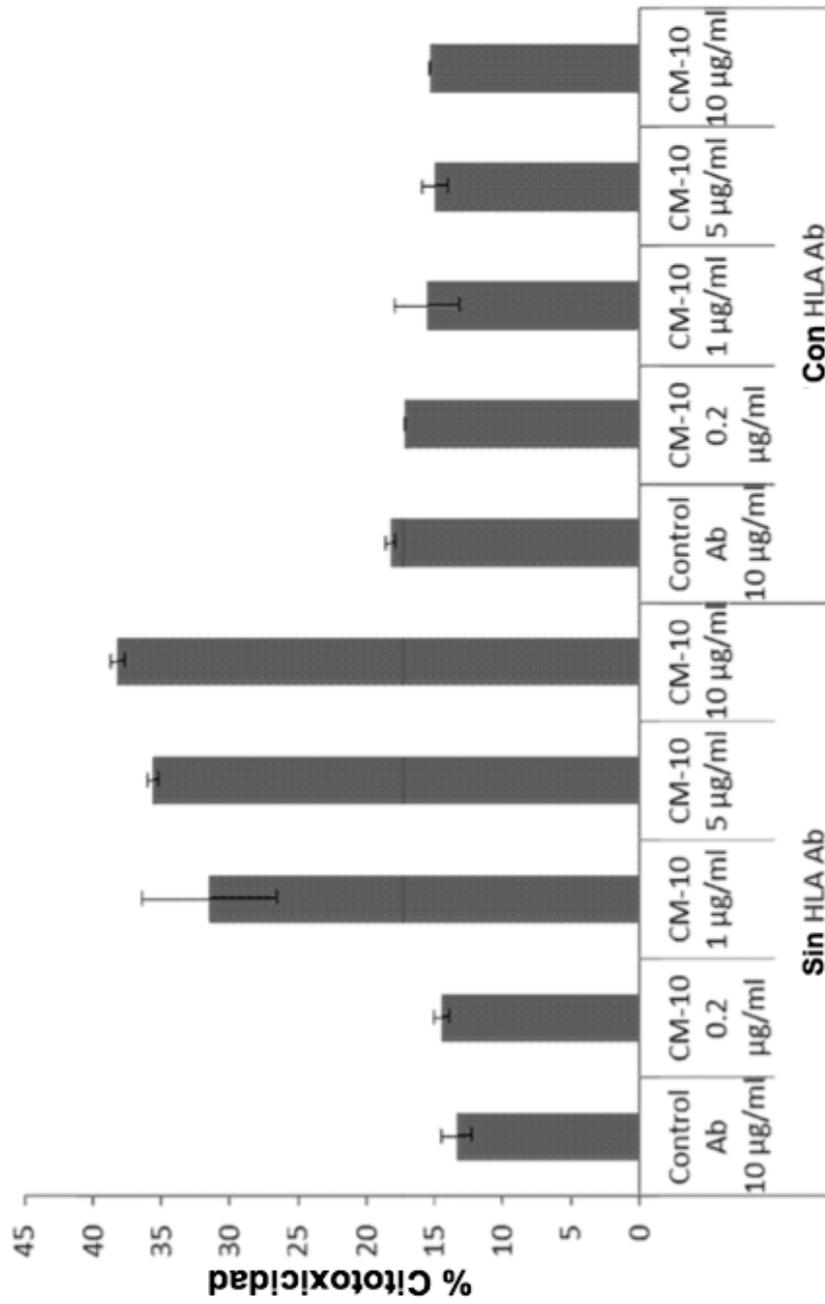


Figura 18

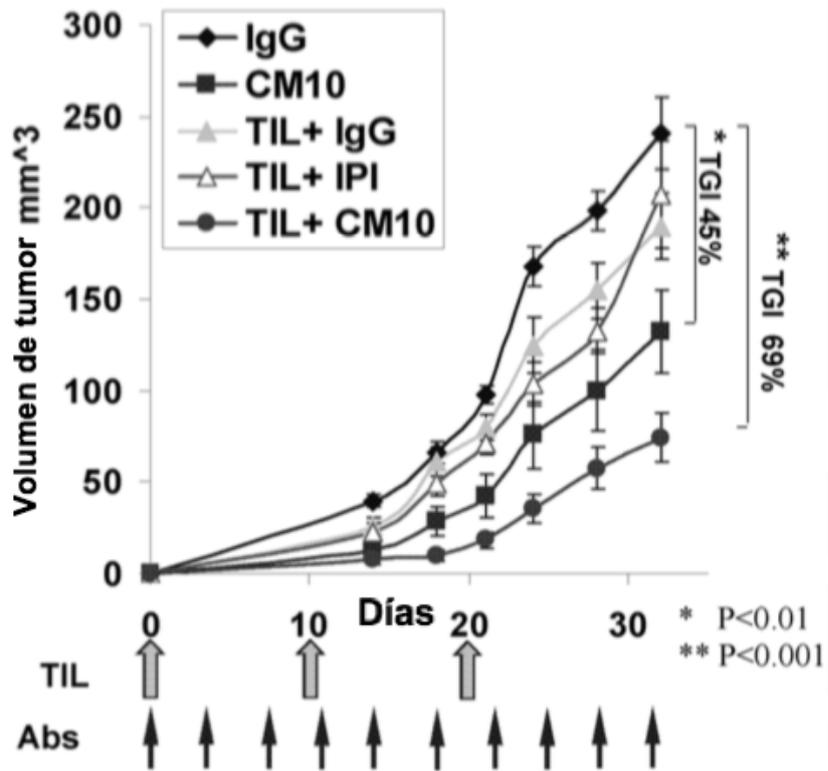


Figura 19

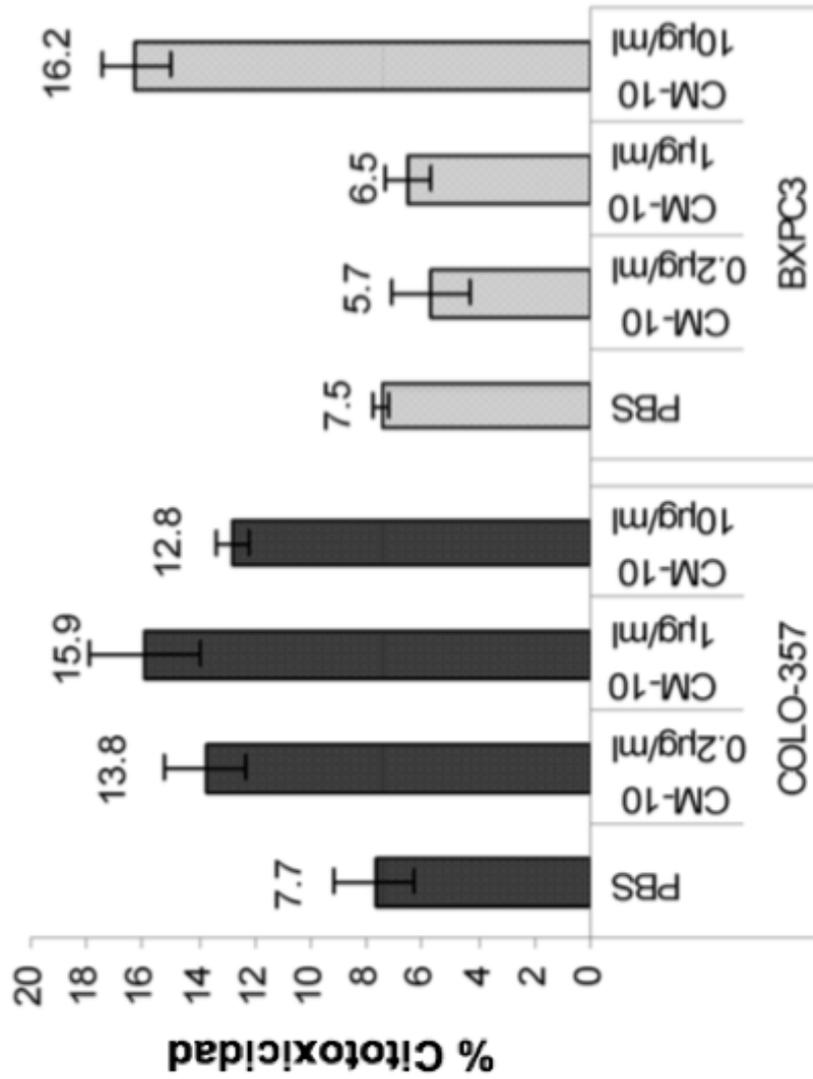


Figura 20

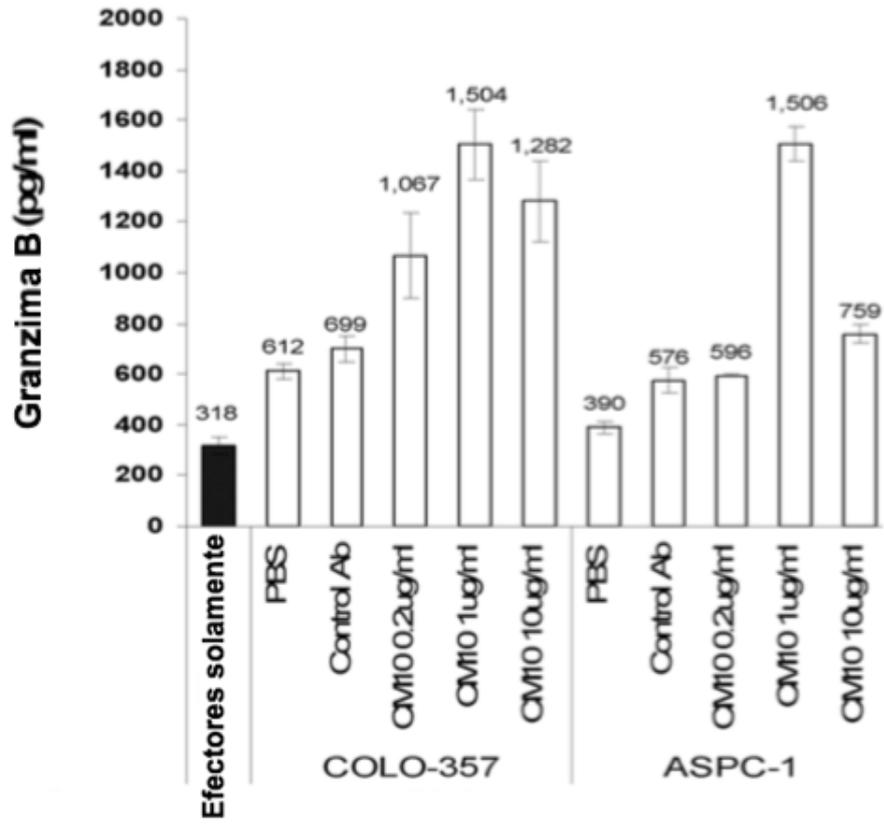


Figura 20 (cont.)

