

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: **2 664 989** 

51 Int. Cl.:	
C07K 16/30	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)
A61K 51/10	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacion	nal: <b>30.09.2</b>	2011 PCT/CA2011/	001081
87 Fecha y número de publicación internacional:	05.04.2012	WO12040824	
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	30.09.2011	E 11827851 (4)	
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea:	17.01.2018	EP 2621955	

54 Título: Anticuerpos ANTI-CEACAM6 y usos de los mismos

### (30) Prioridad:

03.08.2011 US 201161514618 P 01.10.2010 US 388746 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 24.04.2018 73 Titular/es:

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA (100.0%) 1200 Montreal Road Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA

(72) Inventor/es:

ZHANG, JIANBING; BARAL, TOYA NATH y MURAD, YANAL

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

### **Observaciones :**

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

### **DESCRIPCIÓN**

#### Anticuerpos ANTI-CEACAM6 y usos de los mismos

5 Campo de la invención

15

20

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CEACAM6 y usos de los mismos. Más específicamente, la presente invención se dirige a anticuerpos anti-CEACAM6 y fragmentos de los mismos, y a usos de los mismos.

10 Antecedentes de la invención

A pesar de los avances en la investigación y del tratamiento, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo; los carcinomas de pulmón, de mama, de colon, de páncreas y de ovario en particular están entre los que provocan más muertes por cáncer al año. Las opciones de tratamiento para los pacientes de cáncer típicamente se determinan por el tipo y la etapa del cáncer, y pueden incluir la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Generalmente se prefiere la cirugía para cánceres localizados; los cánceres metastatizados requieren a menudo terapias de combinación. La terapia del cáncer con un anticuerpo como monoterapia o junto con otras moléculas antitumorales proporciona indicios alentadores en la lucha contra esta enfermedad crónica. Los anticuerpos también son moléculas de valor en el diagnóstico de diferentes cánceres y pueden tener aplicación de teragnóstico. Sin embargo, sigue existiendo una necesidad constante de tratamiento eficaz y de estrategias de diagnóstico para la mayoría de los cánceres.

La molécula de adhesión celular 6 relacionada con el antígeno carcinoembriónico (CEACAM6), también conocida como un antígeno de reacción cruzada no específico (NCA, del inglés non-specific crossreacting antigen) o CD66c, 25 es una proteína de superficie celular enlazada a glucosilfosfoinositol (GPI) y un miembro de la familia de proteínas de CEACAM en donde comparte una alta homología con CEACAM1, CEACAM7 y CEACAM8. La sobreexpresión de CEACAM6 lleva a un cambio en la morfología similar a la transformación epitelio-mesénguima (Lewis-Wambi et al, 2009), a una mayor invasión (Lewis-Wambi et al, 2009), a una mayor quimiorrestistencia (Duxbury et al, 2004b) y resistencia a la anoikis (Ordonez et al, 2000). La supresión de la expresión génica de CEACAM6 o la inhibición de la 30 función de CEACAM6 puede revertir estos efectos. Se ha documentado la expresión de la proteína CEACAM6 en una variedad de tejidos humanos normales (Buchegger et al, 1984) incluyendo granulocitos; sin embargo, la expresión de CEACAM6 está aumentada en muchos tumores sólidos tales como cáncer de mama, de páncreas, de ovario, de pulmón y de colon (Blumenthal et al, 2007). Se concibe la CEACAM6 como un biomarcador y una posible diana terapéutica para el adenocarcinoma ductal pancreático y para la neoplasia intraepitelial pancreática (Duxbury 35 et al 2004a; Duxbury et al, 2004c; Duxbury et al, 2004d), y otros tipos tumorales. Además, la sobreexpresión de CEACAM6 en tejidos pancreáticos cancerosos promueve la invasión de células cancerosas pancreáticas, la metástasis y la angiogénesis, haciendo que CEACAM6 sea una diana para la terapia del cáncer de páncreas.

- Un aspecto importante de las células cancerosas es su capacidad para inducir angiogénesis. La inhibición de la 40 angiogénesis tumoral se asocia con la supresión del crecimiento tumoral. Los agentes antiangiogénesis usados en los ensayos terapéuticos para tratar el cáncer de páncreas no generan resultados prometedores; sin embargo, fue necesario usar inhibidores de angiogénesis que se dirigen a la ruta de angiogénesis y pueden entrar mejor en el microambiente del cáncer (Wong y Lemoine, 2009). Las metaloproteasas de matriz (MPM) son una familia de enzimas que contienen calcio y zinc implicadas en la degradación de componentes de la matriz extracelular (MEC). 45 En el cáncer, el aumento de la proteolisis extracelular promueve el crecimiento del cáncer, la invasión de tejidos y la metástasis (Kessenbrock et al, 2010). Por ejemplo, en adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP), la actividad de las
- MPM, en particular, MPM-2 y MPM-9, es elevada (Giannopoulos et al, 2008). La actividad de MPM-2 se asocia con el grado de degradación de la membrana basal extracelular; la sobreexpresión de MPM-9 se correlaciona con la metástasis, con la invasión y con el crecimiento en cáncer de páncreas ((Kessenbrock et al, 2010; Armstrong et al, 50
- 2010). También se documentó que la reducción de la secreción y actividad de MPM-2 y MPM-9 inhibió la capacidad de invasión celular en las células cancerosas del páncreas (Han y Zu, 2010). Además, MPM-9 desempeña un papel importante en la promoción de la angiogénesis para el crecimiento del cáncer. La regulación negativa de la expresión de MPM-9 inhibe la invasión y la angiogénesis en células cancerosas del páncreas (Wang et al, 2007). Por estas razones, la inhibición de las actividades de MPM-2 y MPM-9 es un tema importante para la terapia del cáncer de páncreas.
- 55

60

65

La degradación proteolítica de la matriz extracelular (MEC) es importante para la migración de células cancerosas y para que las células cancerosas entren en circulación. La MPM-2 y la MPM-9 están altamente expresadas en tejidos cancerosos pancreáticos (Haw et al, 2000). La degradación de la matriz extracelular mediada por MPM-2/MPM-9 lleva a la invasión de células cancerosas y a la metástasis. Su asociación con la progresión del cáncer también ha sido un principio importante de la investigación del cáncer (Kessenbrock et al, 2010). La MPM-9 se asocia con la renovación de la MEC y la migración celular a través de la MEC. Es una enzima principal que regula la invasión de células cancerosas y la metástasis (Xu et al, 2010; Bjorklund y Koivunen et al, 2005). Los inhibidores de MPM se han usado en combinación con gemcitabina para tratar a pacientes de cáncer de páncreas (Haq et al). En modelos animales, la terapia de combinación de gemcitabina e inhibidor de MPM se puede usar para reducir la implantación del cáncer y mejorar la supervivencia en comparación con el uso solo de gemcitabina o de inhibidor. Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos que implican el uso de inhibidores de MPM para tratar a pacientes no fueron significativos (Coussens et al, 2002; Longo et al, 2008).

- Los estudios previos han demostrado que la inhibición del crecimiento tumoral se puede lograr mediante el 5 silenciamiento de CEACAM6 usando ARNsi específicos de CEACAM6 (Duxbury et al 2004f) o inhibición de la función de CEACAM6 usando un fragmento de anticuerpo puede afectar a la migración celular, la invasión celular y la adhesión celular in vitro (Blumenthal et al, 2005). Estas observaciones sugieren fuertemente que CEACAM6 es un buen biomarcador para diversos tumores. Aunque los anticuerpos anti-CEACAM6 pueden ser candidatos para el desarrollo de fármacos basados en anticuerpos contra el cáncer de páncreas y otros cánceres, se debe tratar con
- cautela las estrategias enfocadas a CEACAM6. A diferencia de anticuerpos tales como Trastuzumab frente a HER2 10 que tiene un efecto directo en la progresión tumoral (Baselga et al. 1999; Vogel et al. 2001), el anticuerpo anti-CEACAM6 no conjugado puede no tener un efecto sobre el crecimiento tumoral (Stricklan et al, 2009) en un estudio in vivo. De manera específica, el anticuerpo monoclonal solo no presentó efectos sobre la progresión tumoral, sin embargo, el mismo anticuerpo conjugado con un fármaco anticancerígeno fue capaz de limitar el desarrollo del tumor en un modelo de ratón. 15

Los anticuerpos monoclonales contra CEACAM6 están disponibles, incluyendo el anticuerpo monoclonal anti-CEACAm6 13-1 (Riley et al, 2009), MAb anti-CEACAM6 (Strickland et al 2009), el anticuerpo monoclonal CEACAM6 (M02), clon 1 G2 (Abnova), el anticuerpo monoclonal antihumano de ratón de CEACAM6 (5F7) (Antibody LifeSpan

- Biosciences), el MAb de CEACAM-6 humano (Clone 439424) (R & D Systems). Todos estos anticuerpos son 20 inmunoglobulinas gamma (IgG) y comparten desventajas en común de tales moléculas, incluyendo la dificultad de su diseño, la dificultad de su producción y la lenta penetración en tejidos cuando se usan in vivo.
- Por tanto, existe una necesidad en la técnica de anticuerpos que tengan alta afinidad pero puedan superar las deficiencias de las IgG y sus variantes, ya que la necesidad de tales anticuerpos es mayor en la investigación, como 25 reactivos para diagnósticos in vitro o in vivo, y en tratamientos para enfermedades asociadas con CEACAM6.

Sumario de la invención

- 30 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CEACAM6 y usos de los mismos. Más específicamente, la presente invención se dirige a anticuerpos anti-CEACAM6 de dominio único y a fragmentos de los mismos, y a usos de los mismos.
- La presente invención proporciona anticuerpos aislados o purificados o fragmentos del mismo específicos para CEACAM6, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo se une a un epítopo que comprende la secuencia 35 NRIGYSWYKG (SEQ ID NO:7).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo, que comprende

40

45

60

una región determinante de complementariedad (CDR) 1 que comprende la secuencia de GRTNSVYTMG (SEQ ID NO:1);

- una CDR2 que comprende la secuencia de IMWGAGTNTHYADSVKG (SEQ ID NO:2); y
- una CDR3 que comprende la secuencia de AANRGIPIAGRQYDY (SEQ ID NO:3),

en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es específico para CEACAM6. El anticuerpo aislado o purificado o el fragmento del mismo tal como se acaba de describir puede ser un anticuerpo de un solo dominio (sdAb). El sdAb 50 puede ser de origen camélido. En un ejemplo, el anticuerpo aislado o purificado o el fragmento del mismo puede comprender la secuencia:

# QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCRTSGRTNSVYTMGWFRQAPGKEREFVAQIMWGAG **TNTHYADSVKGRFTISRDSAESTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAANRGIPIAGRQYDYWG** QGTQVTVSS (SEQ ID NO:4),

55 o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. El anticuerpo aislado o purificado o el fragmento del mismo se puede unir a un epítopo que comprende la secuencia NRIGYSWYKG (SEQ ID NO:7).

Los anticuerpos aislados o purificados o los fragmentos de los mismos descritos en el presente documento pueden estar en forma multivalente. Por ejemplo, los anticuerpos aislados o purificados o los fragmentos de los mismos se pueden expresar unidos a un fragmento de Fc; en un ejemplo específico, el fragmento Fc puede ser Fc2b de ratón o la Fc1 de humano.

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica los anticuerpos aislados o purificados o fragmentos de los mismos descritos anteriormente. La presente invención también abarca un vector que comprende la molécula de ácido nucleico ya descrita.

5 La presente invención proporciona adicionalmente los anticuerpos aislados o purificados o fragmentos de los mismos descritos en el presente documento inmovilizados sobre una superficie.

Además, la presente invención proporciona los anticuerpos aislados o purificados o fragmentos de los mismos enlazados a una molécula de carga. La molécula de carga puede ser cualquier agente de diagnóstico o agente terapéutico adecuado conocido en la materia.

La presente invención también proporciona un método de bloqueo de CEACAM6 y disminuye su invasión; de reducción de la proliferación celular, de la invasión y de la actividad de MPM-9; y de reducción de la capacidad de las células tumorales para promover la angiogénesis. El método comprende la administración de 2A3. 2A3-Fc o una combinación de los mismos a un sujeto que lo necesite.

- La presente invención proporciona adicionalmente un método de detección de tumores in vivo, que comprende:
  - a) administrar el anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la presente invención unido a un
- 20 agente de diagnóstico a un sujeto; y
  - b) detectar la unión del agente de imagen molecular.

En el método in vivo tal como se describe anteriormente, el agente de diagnóstico puede ser un radioisótopo, un marcador paramagnético, un fluoróforo, un fluorocromo de infrarrojo cercano (NIR, del inglés Near Infra-Red) o tinte, 25 un marcador de afinidad, o una molécula detectable basada en proteína mediante fusión genética al anticuerpo. En el método ya descrito, la etapa de detección (etapa b)) se puede llevar a cabo mediante cualquier método de obtención de imágenes apropiado, incluyendo, pero sin limitación, obtención de imágenes ópticas no invasiva, ultrasonido, IRM, PET o SPECT.

30 La presente invención también proporciona un método de diagnóstico de tumores in vitro, que comprende:

a) poner en contacto una muestra tumoral con el anticuerpo aislado o purificado o un fragmento del mismo unido a un agente de diagnóstico: v

- b) detectar la unión del anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo.
- 35

10

15

En el método in vitro tal como se describe anteriormente, el agente de diagnóstico puede ser FITC o proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, por el inglés Enhanced Green Fluorescent Protein) mediante fusión genética al anticuerpo. En el método ya descrito, la etapa de detección (etapa b)) se puede llevar a cabo mediante cualquier método apropiado, incluyendo, pero sin limitación, la obtención de imágenes de fluorescencia.

40

60

65

Tal como se describe en el presente documento, en la actualidad se describen anticuerpos en forma de sdAb que son específicos para CEACAM6. Los sdAb contra CEACAM6, que tienen un efecto inhibidor sobre la proliferación de células BxPC3 en un ensavo in vitro, son candidatos para el desarrollo de fármacos basados en anticuerpos contra cáncer de páncreas y otros cánceres. En particular, 2A3 y 2A3-Fc reconocen un epítopo lineal, NRIGYSWYKG,

- 45 sobre CEACAM6. Los anticuerpos de un solo dominio tales como los identificados en la actualidad son conocidos por poseer estabilidad; presentan facilidad en el diseño de anticuerpos; y tienen una capacidad de penetración de tejidos superior debido a su pequeño tamaño.
- Los sdAb 2A3 y 2A3-Fc bloquearon el antígeno CEACAM6 y disminuyeron su invasión. El tratamiento de las células 50 tumorales BxPC3 con 2A3 o 2A3-Fc redujo la proliferación celular, la invasión y la actividad de MPM-9. Tal tratamiento también redujo la capacidad de los medios acondicionados de las células tumorales pancreáticas para promover la angiogénesis de células HUVEC. En cambio, la gemcitabina solo afectó la proliferación de células BxPC3, no afectó a la actividad de MPM y no redujo la formación de estructuras de tipo capilar de HUVEC. Por tanto, el anticuerpo 2A3 puede ser una adición útil a la gemcitabina en el tratamiento del cáncer de páncreas cuando 55 la gemcitabina sola fallase al inhibir la angiogénesis.

Una ventaja importante de estos anticuerpos sobre los fármacos usados para la quimioterapia es que son más específicos para tumores que sobreexpresan el antígeno CEACAM6. Por lo tanto, esto puede dar como resultado una reducción de toxicidad celular general y de quimiorresistencia a células cancerosas. La versión conjugada con Fc (2A3-Fc) es también ventajosa para su larga semivida en circulación, y su capacidad para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento.

Además, los anticuerpos (Abs) anti-CEACAM6 de diferentes tamaños (2A3, 2A3-Fc, y 9A6 Ab) se marcaron con <sup>64</sup>Cu para generar imágenes de la expresión de CEACAM6 en tumores de páncreas xenoinjertados y de la biodistribución de los anticuerpos in vivo.

La alta expresión de CEACAM6 sobre las células BxPC3 se confirmó mediante alta intensidad de fluorescencia sobre la superficie celular con tinción de FITC-Ab. Estos tres anticuerpos presentaron una fuerte unión de CEACAM6. La inmunotinción *ex vivo* sobre las secciones del tumor a las 24 horas tras la inyección de Ab demostró un direccionamiento específico al tumor tanto de 2A3-mFc como de 9A6. <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3 demostró una rápida

- 5 absorción en el tumor y una rápida eliminación completa del cuerpo. Los tumores BxPC3 se visualizaron claramente con PET de <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3mFc y <sup>64</sup>Cu-DOTA-9A6. A las 24 horas p.i. de <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3mFc y <sup>64</sup>Cu-DOTA-9A6, la absorción tumoral fue del 57,8 ± 3,73 y del 98,2 ± 6,12 % de Dl/g, respectivamente. En comparación con el anticuerpo 9A6 de longitud completa, el anticuerpo 2A3-mFc de cadena pesada presentó una mayor absorción tumoral, una menor absorción hepática y una semivida en circulación más corta. Conclusión: El anticuerpo 2A3-mFc
- 10 es superior al anticuerpo de un solo dominio y al anticuerpo de longitud completa en relación con la detección tumoral y la farmacocinética. Tiene un gran potencial para desarrollarse para la obtención de imágenes y terapia de cáncer pancreático enfocado a CEACAM6.

El anticuerpo de un solo dominio 2A3 anti-CEACAM6 y el anticuerpo de cadena pesada 2A3-Fc se compararon con el anticuerpo monoclonal de ratón comercialmente disponible 9A6. Las tres sondas de imagen de CEACAM6 se evaluaron en un modelo de ratón de cáncer de páncreas humano. Los tres anticuerpos presentaron una acumulación en tumor positiva. Además, las proporciones tumor/no tumor fueron lo suficientemente altas como para presentar un contraste del tumor muy claro. Todos los datos de imágenes respaldaron la viabilidad de las imágenes de cáncer de páncreas al dirigirse a CEACAM6. Especialmente, tanto 2A3-Fc como 9A6 presentaron una elevada proporción tumor/hígado, lo que facilita la detección de cáncer de páncreas primario en una situación real.

Debido a su pequeño tamaño molecular (16 kDa), el sdAb 2A3 presentó una rápida cinética de eliminación. Los tumores fueron claramente visibles tan pronto como 30 min tras la inyección del marcador, con una absorción decente de 4,22 ± 1,13 % de DI/g. Sin embargo, los tumores no mostraron un contraste aparente con el hígado, que puede inhibir la detección del tumor cerca de este órgano. Una ventaja de los anticuerpos de pequeño tamaño es realizar generación de imágenes de forma repetitiva tras el marcaje con radioisótopos de semivida corta tales como <sup>68</sup>Ga (t<sub>1/2</sub> = 68 min) o <sup>18</sup>F (t<sub>1/2</sub>= 108 min) (Han y Zhu, 2010), lo que permite la obtención no invasiva de imágenes secuenciales de la farmacodinámica del fármaco dirigido. Los riñones presentaron una acumulación de radiactividad extremadamente alta que es resultado de la excreción renal-urinaria dominante.

30

35

Con una afinidad de unión más débil y una eliminación más rápida, la deposición de la dosis absoluta fue mucho menor para la sdAb, en comparación con el anticuerpo de longitud completa. En el modelo de BxPC3, 9A6 presentó un aumento de forma gradual en la absorción tumoral con el tiempo. A las 24 horas tras la inyección, la absorción del tumor alcanzó el 57,8 ± 3,73 % de DI/g, que era mayor que la de los anticuerpos anti-EGFR o HER2 en modelos tumorales de EGFR o HER2 positivos (Zhang et al, 2009a; 2009b). Sin embargo, la proporción de tumor frente a sangre fue solo de 3,61, perteneciente a su largo tiempo de circulación en sangre.

Con la unión bivalente, 2A3-Fc presentó una mejor deposición que su equivalente de un solo dominio, todavía se eliminó más rápido de la circulación que el anticuerpo intacto debido a su tamaño molecular más pequeño. A las 24
horas tras la inyección, los tumores BxOC3 presentaron una acumulación extremadamente alta de 2A3-Fc (98,2 ± 6,12 % de Dl/g), lo que es significativamente mayor que la de 9A6. Las proporciones de tumor/no tumor también fueron mucho mayores que los de 9A6, especialmente la proporción tumor/sangre (9,25 ± 1,64 frente a 3,61 ± 0,28). Tan pronto como 8 horas tras la inyección del marcador, el tumor presentó un contraste aparente con el hígado. Sin embargo, cabe destacar que la alta absorción tumoral también estuvo parcialmente relacionada con el tamaño tumoral, que fue relativamente pequeño en el momento de la obtención de imágenes (promedio de 184 mm<sup>3</sup>). Aproximadamente el 18 % de la dosis total inyectada se distribuyó a la región del tumor. Con un tamaño molecular de aproximadamente 80 kDa, 2A3-Fc aún presentó mucha menos excreción renal-urinaria en comparación con el anticuerpo de un solo dominio, 2A3.

- 50 Con el fin de confirmar la especificidad de la distribución de anticuerpos en la región del tumor, la obtención de imágenes por PET también se realizó con un anticuerpo de control, IgG de murino. El tumor presentó una absorción de radiactividad de 8,33 ± 1,06 % DI/g, que fue de la perfusión no específica del anticuerpo (Birkedal-Hansen et al, 2008). Basándose en la gran diferencia de la absorción en tumor entre IgG y 9A6, es razonable concluir que la elevada absorción en tumor de 9A6 principalmente fue resultado del direccionamiento específico del anticuerpo
- 55 hacia el antígeno CEACAM6. En investigaciones adicionales de la distribución microscópica de 9A6 y 2A3-Fc en los tumores BxPC3, se descubrió que 2A3-Fc presentaba una distribución más difusa que 9A6. Además, la unión de membrana celular de ambos anticuerpos se distinguió claramente, lo que confirmó la unión específica de los anticuerpos (Figura 6). Sin embargo, 2A3-Fc no logró la distribución homogénea en el tumor.

#### 60 Breve descripción de los dibujos

Éstas y otras características de la invención se describirán a continuación a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

65 la FIGURA 1A muestra la respuesta inmunitaria de IgG frente a CEACAM6 recombinante de una llama inmunizada con células de 4 líneas diferentes de células tumorales, tal como se mide mediante ELISA. El día 1

(círculo vacío), el día 49 (círculo lleno) y el día 71 (cuadrado lleno) se detectaron respuestas inmunitarias para CEACAM6 recubierta con anticuerpo anti-llama. La FIGURA 1B es un gráfico que muestra el enriquecimiento de CEACAM6 que se une a fagémidos en diferentes rondas de selección en comparación con la unión no específica. La FIGURA 1C muestra la secuencia de aminoácidos de 2A3. La FIGURA 1D muestra las construcciones (parte superior) y el dibujo esquemático (parte inferior, marcados como dominio único y cadena pesada, respectivamente) de los anticuerpos 2A3 y 2A3-Fc. Los sdAb son las regiones variables de los anticuerpos de cadena pesada de camélido. Se pueden clonar y expresar o bien solas, o se pueden clonar y expresar fusionadas con un fragmento Fc de un anticuerpo. En la presente invención, el sdAb 2A3 se subclonó en un vector pTT5 de expresión en mamíferos con el fragmento Fc2b de ratón.

- 10 La FIGURA 2 muestra un cromatograma de exclusión por tamaño de 2A3 purificado por IMAC usando una columna Superdex 75. La separación de Superdex se llevó a cabo en PBS. El tamaño de los marcadores moleculares (en kDa) se indican en la parte superior.
- 15 La FIGURA 3 muestra un gel SDS-PAGE de reducción de los anticuerpos 2A3 y 2A3-Fc purificados. El 2A3-Fc recombinante es de aproximadamente la mitad del tamaño de una IgG convencional. El sdAb 2A3 y el 2A3-Fc se expresaron y purificaron a más del 95 % de pureza (mediante SDS-PAGE).
- La FIGURA 4A muestra el perfil de DC de 2A3 medido a temperatura ambiente. La FIGURA 4B muestra el análisis de DC de medición de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de 2A3. Los valores de DC medidos a 217 nm se representan frente a la temperatura que varía de 25 a 91 (línea punteada con los cuadrados). La línea sólida muestra los valores ajustados usando el programa GraphPad Prism.
- La FIGURA 5A es un gráfico que muestra la capacidad de unión a CEACAM6 de 2A3 tras 24 horas de incubación en suero de ratón a 37 °C en comparación con su función de unión inicial (0 horas) tal como se mide mediante ELISA. La dilución seriada de 1/5 comenzó a una concentración de 10 µg/ml. La FIGURA 5B muestra los perfiles de Biacore obtenidos en el cálculo de la afinidad de 2A3 por CEACAM6 recombinante mediante resonancia de plasmón superficial (SPR); Los perfiles de Biacore de 2A3 a concentraciones que varían de 1 a 60 nM se ajustaron en 1:1 a un modelo de unión de Langmuir usando BIAevaluation 4.1. La FIGURA 5C muestra los perfiles de Biacore de 2A3-Fc (izquierda) y 9A6 (derecha). La FIGURA 5D muestra los resultados del mapeo de epítopos del sdAb 2A3. Dos puntos (parte superior) que se corresponden con dos péptidos de CEACAM6 (parte inferior; HNLPQNRIGYSWYKG, SEQ ID NO:5; NRIGYSWYKGERVDG, SEQ ID NO:6) se tiñeron positivamente mediante 2A3 en una matriz de péptidos de CEACAM6.
- La FIGURA 6A muestra un análisis por transferencia de Western de la unión de 2A3 a CEACAM6 recombinante expresada en células de mamífero (panel izquierdo) o CEACAM6 en lisados de células BxPC3 (panel derecho). La detección se lleva a cabo usando anticuerpo anti-llama de cabra y después anticuerpo anti-cabra de cerdo conjugado con HRP. Se indican los marcadores moleculares (en kDa). La FIGURA 6B muestra células BxPC3 teñidas con 2A3 marcado con FITC (tinción de FITC verde presentada como brillo en la figura). El DAPI se usó para teñir el núcleo, y 2A3-FITC para la tinción de CEACAM6. La FIGURA 6C muestra los resultados del análisis de FACS de la unión de 2A3 a células BxPC3, LS174T y A549. El 2A3 marcado con FITC se incubó con células fijadas y se analizó mediante FACS. El 2A3 (panel derecho) y el S20, un anticuerpo de control (panel izquierdo) se usaron a una concentración de 5 µg/ml.
- 45 La FIGURA 7 muestra el nivel de expresión de CEACAM6 por las células BcPC3 y HUVEC y en sus medios acondicionados. En la FIGURA 7A, el anticuerpo 2A3-Fc se conjugó con Alexa Fluor 594 para visualizar por inmunocitoquímica la expresión de CEACAM6 sobre la superficie de células BxPC3 (derecha). Se usó el isotipo control VTI1-Fc como control negativo (izquierda). Se usó DAPI como tinción del núcleo. Mientras que 2A3-Fc tiñó positivamente a las BxPC3, el anticuerpo de control VYI1-Fc no tiñó a las células. La FIGURA 7B muestra un análisis por transferencia de Western para detectar CEACAM6 en células BxPC3 y HUVEC. Mientras que las células BxPC3 presentaron niveles muy altos de expresión de CEACAM6, no se detectó CEACAM6 en el medio de cultivo o en las células HUVEC.
- La FIGURA 8A muestra la inhibición de la proliferación de células BxPC3 mediante 2A3 tal como se mide mediante el ensayo del MTT. Las células se cultivaron con el sdAb (2A3), el sdAb de control (BSA12) o sin ningún anticuerpo (sin Ab) durante 5 días por cuadruplicado. La FIGURA 8B es un gráfico de barras que presenta los resultados de proliferación celular para células LS174T, A549 y BxPC3 tal como se mide mediante ensayo del MTT.
- La FIGURA 9 presenta los resultados de la inhibición de la proliferación de células BxPC3 y de las actividades de MPM-9 y MPM-2 por los anticuerpos. La FIGURA 9A muestra los resultados de los ensayos del MTT para los anticuerpos 2A3 y 2A3-Fc anti-CEACAM6 para determinar su efecto sobre la proliferación de células BxPC3; VTI1-Fc, un isotipo de anticuerpo de control que no se une a CEACAM6, se usó como un control negativo. La FIGURA 9B muestra los resultados de la zimografía en gelatina para evaluar las actividades de MPM-9 y MMP-2.
   Los anticuerpos 2A3 y 2A3-Fc presentaron una reducción significativa en la actividad de MPM-9 en los medios de células BxPC3.

La FIGURA 10 muestra los resultados de los ensayos *in vitro* de proliferación y de actividad gelatinasa. La FIGURA 10A es un gráfico que representa el porcentaje de células BxPC3 que proliferan tras el tratamiento con diversas cantidades de 2A3, 2A3-Fc o gemcitabina durante 72 horas (n=5); la proliferación celular en medio de inanición se usó como control. Las Cl<sub>50</sub> para 2A3, 2A3-Fc y gemcitabina se calcularon como 6,5 μM, 8 μM y 12 nM, respectivamente. La FIGURA 10B muestra los resultados de la zimografía en gelatina para examinar las actividades de MPM-2 y MMP-9. 2A3/2A3Fc, pero no la gemcitabina, inhibieron la actividad de MPM-9. La actividad de MPM-2 no se vió afectada por el tratamiento. La FIGURA 10C es un gráfico que muestra la escala de reducción de la actividad de MPM-9 provocada por el tratamiento de 2A3/2A3-Fc. Actividad de MPM-9 con 2A3, diamantes rellenos; Actividad MPM-2 con 2A3, diamantes vacíos; Actividad de MPM-9 con gemcitabina, círculos rellenos; Actividad de MPM-2 con gemcitabina, círculos vacíos.

La FIGURA 11A muestra la inhibición de la actividad de invasión de BxPC3 mediante el tratamiento con 2A3/2A3-Fc. Las células de tres campos seleccionados aleatoriamente se contaron y se normalizaron frente a un medio de inanición de control. Tanto 2A3 como 2A3-Fc redujeron la actividad de invasión de BxPC3. Las células invasivas sobre la superficie inferior se tiñeron con Calceína AM y se tomaron fotos a un aumento de 100 X. La FIGURA 11B es un gráfico de barras que muestra la escala de reducción de células BxPC3 mediante 2A3 y 2A3-Fc. Las células invasivas sobre la superficie inferior se tiñeron con Calceína AM y se contaron mediante 2A3 y 2A3-Fc. Las células invasivas sobre la superficie inferior se tiñeron con Calceína AM y se contaron mediante 2A3 y 2A3-Fc. Las células invasivas sobre la superficie inferior se tiñeron con Calceína AM y se contaron mediante microscopía de fluorescencia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. \*\* P < 0,01

La FIGURA 12A muestra la inhibición de la formación de túbulos en células HUVEC tratadas con medios acondicionados de células BxPC3 tratadas con 2A3 o 2A3-Fc. Tanto 2A3 como 2A3-Fc redujeron la formación de vasos por las células BxPC3. Se capturaron tres campos que se eligieron de manera aleatoria y se midió la longitud del capilar en cada campo. \*\* *P* < 0,01 en 2A3 y \*\*\* *P* < 0,001 en 2A3-Fc. La FIGURA 12B es un gráfico de barras que muestra la escala de inhibición de la formación de vasos de tipo capilar (angiogénesis) por 2A3 o 2A3-Fc. El sdAb 2A3 inhibió la formación de túbulos en un 21 % y 2A3-Fc inhibió la formación de túbulos en un 49 %.</p>

La FIGURA 13A muestra los resultados de la inmunotinción *in vitro* de células UM-SCC-22B negativas en CEACAM6 y de células BxPC3 positivas en CEACAM 6. Se muestran los resultados de los ensayos de absorción en células (FIGURA 13B) y del eflujo (FIGURA 13C) de <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc y <sup>64</sup>Cu-DOTA-IgG sobre células BxPC3 o UM-SCC-22B. La absorción en células y el eflujo se expresó como el porcentaje de radiactividad de entrada total con la disminución corregida. Los datos fueron de 2 experimentos con muestras por triplicado y se expresan como la media ± DT. La FIGURA 13D muestra las secciones del tumor BxPC3 teñidas *in vitro* con anticuerpos anti-CEACAM6 marcados con FITC para demostrar que las células conservan la expresión de 35 CEACAM6 tras el crecimiento en ratones. La flecha (<sup>e</sup>) indica la localización de la fluorescencia.

La FIGURA 14 muestra imágenes del microPET de cuerpo completo (plano coronal) de ratones que llevan el tumor BxPC3 en diferentes puntos temporales tras la inyección en la vena de la cola de 3,7 MBq de 64Cu-DOTA-2A3, 64Cu-DOTA-2A3-mFc, 64Cu-DOTA-9A6 y 64Cu-DOTA-IgG. Los tumores se indican mediante flechas blancas en el último punto temporal. El plano mostrado se seleccionó para mostrar mejor la sección transversal del tumor.

La FIGURA 15 muestra los valores de absorción a diferentes puntos tras la inyección del marcador en los riñones, hígado, músculo y tumor BxPC3 cuantificados a partir del análisis de las regiones de interés (RDI) en escaneos de microPET (n = 4).

La FIGURA 16 es un gráfico de barras que indica la biodistribución de 18F-FBEM-EM3106B en ratones desnudos atímicos que llevan el tumor BxPC3 tras la obtención de imágenes por microPET en el punto temporal de 2 h (2A3; n = 4) o en el punto temporal de 24 h (2A3-Fc, 9A6 e IgG; n = 4).

50

40

45

5

10

15

La FIGURA 17 muestra imágenes de secciones de tumor teñidas con IgG humana anti-ratón en burro conjugada con Cy3. Las secciones también se cotiñeron con CD31 para la visualización de la vasculatura del tumor (▼ Dylight 488 para CD31; <sup>\Sub</sup> Cy3 para

55 CEACAM6; ⇒ DAPI para la visualización de los núcleos).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CEACAM6 y usos de los mismos. Más específicamente, la presente invención se dirige a anticuerpos anti-CEACAM6 y fragmentos de los mismos, y a usos de los mismos.

La presente invención proporciona anticuerpos aislados o purificados o fragmentos del mismo específicos para CEACAM6, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo se une a un epítopo que comprende la secuencia NRIGYSWYKG (SEQ ID NO:7).

El término "anticuerpo", también citado en la materia como "inmunoglobulina" (Ig), usado en el presente documento, se refiere a una proteína construida a partir de cadenas de polipéptidos ligeras y pesadas emparejadas; existen diversos isotipos de Ig, incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cuando un anticuerpo está correctamente plegado, cada cadena se pliega en una serie de dominios globulares diferentes unidos por secuencias de polipéptidos más lineales.

- 5 Por ejemplo, la cadena ligera de la inmunoglobulina se pliega en un dominio variable (V<sub>L</sub>) y un dominio constante (C<sub>L</sub>), mientras que la cadena pesada se pliega en un dominio variable (V<sub>H</sub>) y tres dominios constantes (C<sub>H</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>). La interacción de los dominios variables de cadena pesada y ligera (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>) da como resultado la formación de una región de unión a antígeno (Fv). Cada dominio tiene una estructura bien establecida familiar para los expertos en la materia.
- 10
  - Las regiones variables de cadena ligera y pesada son responsables de la unión al antígeno diana y, por lo tanto, presentan una diversidad de secuencia significativa entre los anticuerpos. Las regiones constantes presentan menos diversidad de secuencia, y son responsables de la unión a una serie de proteínas naturales para generar sucesos inmunológicos importantes. La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión a antígeno de la
- 15 molécula, y por tanto, determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La mayoría de la variabilidad de secuencia tiene lugar en seis regiones hipervariables, tres por cada cadena pesada y ligera variable; las regiones hipervariables se combinan para formar el sitio de unión a antígeno, y contribuyen a la unión y al reconocimiento de un determinante antigénico. La especificidad y afinidad de un anticuerpo por su antígeno se determina mediante la estructura de las regiones hipervariables, así como su tamaño, su forma y la química de la
- 20 superficie que presentan al antígeno. Existen diversos esquemas para la identificación de las regiones de hipervariabilidad, siendo las dos más comunes aquellas de Kabat y Chothia y Lesk. Kabat et al (1991a; 1991b) define las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) basándose en la variabilidad de secuencia en las regiones de unión a antígeno de los dominios VH y VL. Chothia y Lesk (1987) definen los "bucles hipervariables" (H o L) basándose en la localización de las regiones estructurales de bucle en los dominios VH y VL. Como estos
- esquemas individuales definen las CDR y las regiones de bucle hipervariable que son adyacentes o que se solapan, los expertos en la materia de anticuerpos a menudo utilizan los términos "CDR" y "bucle hipervariable" de manera intercambiable, y así se pueden usar en el presente documento. Por este motivo, las regiones que forman el sitio de unión a antígeno se citan como CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, CDR H3 en el caso de los anticuerpos que comprenden un dominio VH y un dominio VL; o como CDR1, CDR2, CDR3 en el caso de las
- 30 regiones de unión a antígeno de bien una cadena pesada o una cadena ligera. Las CDR/bucles se citan en el presente documento de acuerdo con el sistema de numeración IMGT (Lefranc et al, 2003) que se desarrolló para facilitar la comparación de dominios variables. En este sistema, los aminoácidos conservados (tales como Cys23, Trp41, Cys 104, Phe/Trp 118 y un resto hidrófobo en la posición 89) siempre tienen la misma posición. Además, se proporciona una delimitación estandarizada de las regiones marco (RM1: posiciones 1 a 26; RM2: 39 a 55; RM3: 66
- 35 a 104; y RM4: 118 a 128) y de las CDR (CDR1: 27 a 38, CDR2: 56 a 65; y CDR3: 105 a 117).

Un "fragmento de anticuerpo" tal como se cita en el presente documento puede incluir cualquier fragmento de anticuerpo de unión a antígeno conocido en la materia. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo de origen natural o se puede obtener mediante la manipulación de un anticuerpo de origen natural o mediante el uso de métodos recombinantes. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede incluir, pero sin limitación, un Fv, un Fv de cadena simple (scFv; una molécula que consiste en V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> conectados con un enlazador peptídico), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpo de un solo dominio (sdAb; un fragmento compuesto de un único V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub>), y presentaciones multivalentes de cualquiera de estos.

- 45 En un ejemplo no limitante, el fragmento de anticuerpo puede ser un sdAb que proviene de fuentes de origen natural. Los anticuerpos de cadena pesada de origen camélido (Hamers-Casterman et al, 1993) carecen de cadenas pesadas y, por lo tanto, sus sitios de unión a antígeno consisten en un dominio, denominado V<sub>H</sub>H. También se han observado sdAb en tiburón y se denominan V<sub>NAR</sub> (Nutall et al, 2003). Otros sdAb se pueden diseñar genéticamente basándose en las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera de Ig humana (Jespers et al, 2004; To et al,
- 50 2005). Tal como se usa en el presente documento, el término "sdAb" incluye aquellos sdAb aislados directamente a partir del reservorio de V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>H, V<sub>L</sub>, o V<sub>NAR</sub> de cualquier origen mediante presentación en fago u otra tecnología, sdAb que proviene del sdAb mencionado anteriormente, sdAb producido de forma recombinante, así como aquellos sdAb generados mediante modificación adicional de tal sdAb mediante humanización, maduración por afinidad, estabilización, solubilización, por ejemplo, camelización u otros métodos de diseño de anticuerpos. También están abarcados por la presente invención los homólogos, derivados o fragmentos que conservan la función de unión a
- 55 abarcados por la presente invención los homólogos, derivados o fragmentos que conservan la función de unión a antígeno y la especificidad del sdAb.

Los sdAb son excelentes bloques de construcción para nuevas moléculas de anticuerpo debido a su alta termoestabilidad, a su alta resistencia a detergentes, a su relativamente alta resistencia a las proteasas (Dumoulin et al, 2002) y a su alto rendimiento de producción (Arbabi-Ghahroudi et al, 1997); también se pueden diseñar genéticamente para que tengan alta afinidad mediante aislamiento a partir de una biblioteca inmunológica (Li et al, 2009) o mediante maduración por afinidad *in vitro* (Davies y Riechmann, 1996).

Un experto en la materia estaría familiarizado con la estructura de un anticuerpo de un solo dominio (véase, por ejemplo, 3DWT, 2P42 en Protein Data Bank). Un sdAb comprende un solo dominio de inmunoglobulina que mantiene el pliegue de inmunoglobulina; lo más destacable, solo tres CDR forman el sitio de unión a antígeno. Sin embargo, y como entenderán los expertos en la materia, no se requieren todas las CDR para la unión al antígeno. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, una, dos o tres de las CDR pueden contribuir a la unión y el reconocimiento del antígeno mediante el sdAb de la presente invención. Las CDR del sdAb o el dominio variable se citan en el presente documento como CDR1, CDR2 y CDR3, y se numeran tal como se define por Kabat et al (1991b).

5

10

El anticuerpo de un solo dominio o fragmento del mismo de la presente invención es específico para la molécula de adhesión celular 6 relacionada con el antígeno carcinoembriónico (CEACAM6). CEACAM6 es también conocido en la materia como antígeno de reacción cruzada no específico (NCA) o CD66c. Mientras que se ha observado CEACAM6 en tejidos humanos normales (Buchegger et al, 1984), su expresión es elevada en muchos tumores sólidos tales como cáncer de mama, de páncreas, de ovario, de pulmón y de colon (Blumenthal et al, 2007). La secuencia de CEACAM6 puede ser, pero sin limitación:

MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLA HNLPQNRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYPNASLLIQ NVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAF TCEPEVQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNMTLTLLSVKRNDAGSYECEIQN PASANRSDPVTLNVLYGPDGPTISPSKANYRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFI NGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTMITVSGSAPVLSAV ATVGITIGVLARVALI (SEQ ID NO:8),

15 o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

La presente invención proporciona un anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo, que comprende

20 una región determinante de complementariedad (CDR) 1 que comprende la secuencia de GRTNSVYTMG (SEQ ID NO:1);

una CDR2 que comprende la secuencia de IMWGAGTNTHYADSVKG (SEQ ID NO:2); y

25 una CDR3 que comprende la secuencia de AANRGIPIAGRQYDY (SEQ ID NO:3),

en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es específico para CEACAM6. El anticuerpo tal como se ha descrito puede reconocer y unirse a un epítopo que comprende la secuencia NRIGYSWYKG (SEQ ID NO:7).

- 30 Las expresiones "anticuerpo" y "fragmento de anticuerpo" ("fragmento del mismo") son tal como se definen anteriormente. Tal como se ha indicado anteriormente, el anticuerpo o el fragmento del mismo puede ser un sdAb. El sdAb puede ser de origen camélido o provenir de V<sub>H</sub>H de camélido y, por lo tanto, se puede basar en regiones marco de camélidos; como alternativa, la CDR descrita anteriormente se puede insertar en las regiones marco de V<sub>NAR</sub>, V<sub>H</sub>H o V<sub>L</sub>. En otra alternativa más, los bucles hipervariables descritos anteriormente se pueden insertar en las regiones marco de otros tipos de fragmentos de anticuerpos (Fv, scFv, Fab). La presente realización abarca además 35 un fragmento de anticuerpo que es "humanizado" usando cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, pero no se limita a la inserción de CDR y al rechapado. La humanización de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo comprende la sustitución de un aminoácido en la secuencia por su homólogo humano, tal como se encuentra en la secuencia humana consenso, sin la pérdida de la capacidad de unión a antígeno ni de la especificidad; este enfoque reduce la inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento del mismo cuando se introduce 40 en sujetos humanos. En el proceso de inserción de CDR, una o más de una CDR de cadena pesada definidas en el presente documento se pueden fusionar o insertar en una región variable humana (V<sub>H</sub>, o V<sub>L</sub>), o en otras regiones marco de fragmentos de anticuerpo humano (Fv, scFv, Fab). En dicho caso, la conformación de dicho uno o más de un bucle hipervariable se mantiene, y la afinidad y especificidad del sdAb por su diana (es decir, toxinas A y B) también se mantiene. La inserción de CDR es conocida en la materia y se describe en al menos los siguientes: Patente de Estados Unidos N.º 6180370, Patente de Estados Unidos N.º 5693761, Patente de Estados Unidos N.º 45 6054297, Patente de Estados Unidos N.º 5859205, y Patente Europea N.º 626390. El rechapado, también citado en la materia como "rebarnizado de la región variable", implica humanizar las posiciones expuestas al soluto del anticuerpo o del fragmento; por tanto, los restos internos no humanizados, que pueden ser importantes para la conformación de la CDR, se mantienen, mientras que el potencial de la reacción inmunológica frente a las regiones 50 expuestas al soluto se minimiza. El rechapado es conocido en la materia y se describe en al menos los siguientes:
- expuestas al soluto se minimiza. El rechapado es conocido en la materia y se describe en al menos los siguientes: Patente de Estados Unidos N.º 5869619, Patente de Estados Unidos N.º 5766886, Patente de Estados Unidos N.º 5821123, y Patente Europea N.º 519596. Los expertos en la materia estarán ampliamente familiarizados con los métodos de preparación de tales fragmentos de anticuerpo humanizados.

En un ejemplo específico no limitante, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender la secuencia:

# QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCRTSGRTNSVYTMGWFRQAPGKEREFVAQIM WGAGTNTHYADSVKGRFTISRDSAESTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAANRGIPIAG RQYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:4),

#### 5 o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

Una secuencia sustancialmente idéntica puede comprender una o más mutaciones conservativas de aminoácidos. Es sabido en la materia que una o más de una mutación conservativa de aminoácidos para una secuencia de referencia puede producir un péptido mutante sin cambios sustanciales en las propiedades fisiológicas, químicas o funcionales en comparación con la secuencia de referencia; en tal caso, la secuencia mutante y la secuencia de referencia se considerarían polipéptidos "sustancialmente idénticos". La mutación conservativa de aminoácidos puede incluir la adición, la deleción o la sustitución de un aminoácido; una sustitución conservativa de aminoácido se define en el presente documento como la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, tamaño, carga o polaridad).

15 En

10

60

En un ejemplo no limitante, una mutación conservativa puede ser una sustitución de aminoácidos. Tal sustitución conservativa de aminoácidos puede sustituir a un aminoácido básico, neutro, hidrófobo o ácido por otro del mismo grupo. Con la expresión "aminoácido básico" se refiere a aminoácidos hidrófobos que tienen un valor pK de cadena lateral de más de 7, que están cargados positivamente a pH fisiológico. Los aminoácidos básicos incluyen histidina

- (His o H), arginina (Arg o R), y lisina (Lys o K). Con la expresión "aminoácido neutro" (también "aminoácido polar"), se refiere a aminoácidos hidrófilos que tienen una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos una unión en la que el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene más de cerca por uno de los átomos. Los aminoácidos polares incluyen serina (Ser o S), treonina (Thr o T), cisteína (Cys o C), tirosina (Tyr o Y), asparagina (Asn o N) y glutamina (Gln o Q). El término "aminoácido hidrófobo" (también
- 25 "aminoácido no polar") se refiere a que incluye aminoácidos que presentan hidrofobicidad de más de cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg (1984). Los aminoácidos hidrófobos incluyen prolina (Pro o P), isoleucina (Ile o I), fenilalanina (Phe o F), valina (Val o V), leucina (Leu o L), triptófano (Trp o W), metionina (Met o M), alanina (Ala o A), y glicina (Gly o G). "Aminoácido ácido" se refiere a aminoácidos hidrófilos que tienen un valor pK de cadena lateral de menos de 7, que están cargados negativamente a pH fisiológico. Los aminoácidos ácidos incluyen glutamato (Glu o E) y aspartato (Asp o D).

La identidad de secuencia se usa para evaluar la similitud de dos secuencias; se determina calculando el porcentaje de restos que son los mismos cuando las dos secuencias se alinean en máxima correspondencia entre las posiciones de los restos. Cualquier método conocido se puede usar para calcular la identidad de secuencia; por ejemplo, el programa informático está disponible para calcular la identidad de secuencia. Sin desear ser limitante, la identidad de secuencia se puede calcular mediante programas informáticos tales como el servicio BLAST2 del NCBI mantenido por el Instituto Suizo de Bioinformática (y que se encuentra en http://ca.expasy.org/tools/blast/) BLAST-P, Blast-N, o FASTA-N, o cualquier otro programa informático apropiado que se conozca en la materia.

40 Las secuencias sustancialmente idénticas de la presente invención pueden ser al menos el 85 % idénticas; en otro ejemplo, las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser al menos el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100 % (o cualquier porcentaje entre los mismos) idénticas a nivel de aminoácidos con las secuencias descritas en el presente documento. Cabe destacar que, las secuencias sustancialmente idénticas conservan la actividad y la especificidad de la secuencia de referencia. En una realización no limitante, la diferencia 45 en la identidad de secuencia se puede deber a mutaciones conservativas de aminoácidos.

El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención también puede comprender secuencias adicionales para ayudar en la expresión, detección o purificación de un anticuerpo recombinante o de un fragmento del mismo. Se puede usar cualquiera de estas secuencias o marcadores conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo,

- 50 y sin desear ser limitante, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una secuencia de direccionamiento o secuencia señal (por ejemplo, pero sin limitación, ompA), un marcador de detección (por ejemplo, pero sin limitación, c-Myc), un marcador de purificación (por ejemplo, pero sin limitación, His₅ o His₀) o una combinación de los mismos. En otro ejemplo, la secuencia adicional puede ser un sitio de reconocimiento de biotina tal como el descrito por Cronan et al en el documento WO 95/04069 o Voges et al en el documento
- 55 WO/2004/076670. Como también es sabido por los expertos en la materia, se pueden usar secuencias de enlazadores junto con las secuencias o marcadores adicionales.

El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención también puede estar en forma multivalente. La multimerización se puede lograr mediante cualquier método adecuado conocido en la materia. Por ejemplo, y sin desear ser limitante de ningún modo, la multimerización se puede lograr usando moléculas de autoensamblaje como las descritas en Zhang et al (2004a; 2004b) y en el documento WO2003/046560. El método descrito produce

pentacuerpos mediante expresión de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención y el dominio de pentamerización de la subunidad B de una familia de toxina AB<sub>5</sub> (Merrit y Hol, 1995); el dominio de pentamerización se ensambla en un pentámero, a través del cual se forma una disposición multivalente del anticuerpo o del fragmento del mismo. Además, el dominio de pentamerización puede estar unido al anticuerpo o al fragmento del anticuerpo usando un enlazador; tal enlazador sería de la longitud suficiente y de la

- 5 anticuerpo o al fragmento del anticuerpo usando un enlazador; tal enlazador sería de la longitud suficiente y de la composición apropiada como para proporcionar una unión flexible de las dos moléculas, pero no debería obstaculiza las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo.
- Otras formas de disposición multivalente también están abarcadas por la presente invención. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, el anticuerpo o el fragmento del mismo se puede presentar como un dímero, un trímero o cualquier otro oligómero adecuado. Esto se puede lograr mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo, conexión de enlace directo (Nielson et al, 2000), interacción c-jun/Fos (de Kruif y Logtenberg, 1996), interacción de "pomos en agujeros" (Ridgway et al, 1996).
- 15 Otro método conocido en la materia para la multimerización es dimerizar el anticuerpo o el fragmento del mismo usando un dominio Fc. Cuando se aplican *in vivo*, los sdAb se eliminan rápidamente de la circulación (Bell et al., 2010). Para solucionar este problema y dar a los sdAb la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria tras la unión al antígeno, los sdAb se pueden fusionar al Fc humano para generar anticuerpos quiméricos de cadena pesada (Bell et al., Cancer Letters, 2010). En este enfoque, el gen de Fc se inserta en un vector junto con el gen
- 20 sdAb para generar una proteína de fusión sdAb-Fc (Bell et al, 2010; Iqbal et al, 2010); la proteína de fusión se expresa de manera recombinante y después se purifica. Tales anticuerpos son fáciles de diseñar genéticamente y de producir (Zhang et al, 2009b), pueden alargar enormemente la semivida sérica de los sdAb y pueden ser excelentes reactivos de obtención de imágenes tumorales (Bell et al., Cancer Letters, 2010).
- El dominio Fc en el complejo multimérico tal como se ha descrito puede ser cualquier fragmento de Fc adecuado conocido en la materia. El fragmento de Fc puede ser de cualquier fuente adecuada; por ejemplo, el Fc puede ser de ratón o de origen humano. En un ejemplo específico no limitante, el fragmento Fc puede ser el fragmento Fc2b de ratón o la Fc1 de humano (Bell et al, 2010; Iqbal et al, 2010).
- 30 La presente invención también abarca secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas que se describen en el presente documento. La secuencia de ácido nucleico puede estar optimizada por codón para la expresión en diversos microorganismos. La presente invención también abarca vectores que comprenden los ácidos nucleicos como los que se han descrito. Además, la invención abarca células que comprenden el ácido nucleico y/o el vector que se han descrito.
- 35

40

La presente invención abarca adicionalmente el anticuerpo aislado o purificado o los fragmentos del mismo inmovilizados en una superficie usando diversas metodologías; Por ejemplo, y sin desear ser limitante, el anticuerpo o fragmento puede estar enlazado o acoplado a la superficie mediante acoplamiento de marcador His, unión a biotina, unión covalente, adsorción y similares. La superficie sólida puede ser cualquier superficie adecuada, por ejemplo, pero no se limita a la superficie del pocillo de una placa de microtítulo, a canales de microplaca sensorial de resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*), a membranas, a perlas (tales como perlas basadas en magnetismo o perlas basadas en sefarosa u otra resina de cromatografía), vidrio, una película o cualquier otra superficie útil.

- 45 La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento del mismo enlazado a una molécula de carga; el anticuerpo o fragmento del mismo puede administrar la molécula de carga a un sitio deseado. La molécula de carga puede ser cualquier tipo de molécula que pueda diagnosticar o reducir/inhibir el crecimiento de tumores. Por tanto, la molécula de carga puede estar unida a un agente terapéutico o a un agente de diagnóstico.
- 50 Por ejemplo, y sin desear ser limitante de ningún modo, el agente terapéutico puede ser un radioisótopo, que se puede usar para radioinmunoterapia; una toxina, tal como una inmunotoxina; una citocina, tal como una inmunocitocina; una citotoxina; un inductor de apoptósis; una enzima; o cualquier otra molécula terapéutica adecuada conocida en la materia. Como alternativa, un agente de diagnóstico puede incluir, pero sin limitación, un radioisótopo, un marcador paramagnético tal como gadolinio u óxido de hierro, un fluoróforo, un fluorocromo de infrarroia corrona (NIR) o tinto (tal como Cu2, Cu5 5, Aloxa680, Duliptt680, o Duliptt680, un marcador do afinidad
- 55 infrarrojo cercano (NIR) o tinte (tal como Cy3, Cy5.5, Alexa680, Dylight680, o Dylight800), un marcador de afinidad (por ejemplo biotina, avidina, etc), fusionado a una molécula detectable basada en proteína o cualquier otro agente adecuado que se pueda detectar por métodos de obtención de imágenes. En un ejemplo específico no limitante, el anticuerpo o el fragmento del mismo puede estar unido a un agente fluorescente tal como FITC o puede estar genéticamente fusionado con la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP).
  - Los anticuerpos de la presente invención enlazados a un agente de diagnóstico, también denominados en el presente documento como agente de imagen molecular, se pueden usar para realizar la obtención de imágenes de diagnóstico. La técnica de obtención de imágenes puede incluir la obtención de imágenes del cuerpo completo para fines de diagnóstico o la obtención de imágenes locales de zonas específicas, tales como, pero sin limitación, los lugares del crecimiento del tumor, de forma cuantitativa para evaluar la progresión de la enfermedad o la respuesta
- 65 lugares del crecimiento del tumor, de forma cuantitativa para evaluar la progresión de la enfermedad o la respuesta del hospedador a un régimen de tratamiento. La obtención de imágenes se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*

mediante cualquier método adecuado conocido en la materia. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, la técnica de obtención de imágenes de diagnóstico puede incluir inmunohistoquímica, tinción por inmunofluorescencia o una tecnología de obtención de imágenes de diagnóstico no invasiva (molecular) que incluye, pero sin limitación:

- 5 Obtención de imágenes ópticas;
  - Tomografía de emisión por positrones (PET, del inglés *Positron emission tomography*), en donde el agente detectable es un isótopo tal como <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>18</sup>F, <sup>64</sup>Cu, <sup>62</sup>Cu, <sup>124</sup>I, <sup>76</sup>Br, <sup>82</sup>Rb y <sup>68</sup>Ga, siendo <sup>18</sup>F el más utilizado clínicamente;
- 10

20

40

- Tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT, del inglés Single photon emission computed tomography), en donde el agente detectable es un radiomarcador tal como <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>I, <sup>201</sup>TI, <sup>133</sup>Xe, en función de la aplicación específica;
- Imagen por resonancia magnética (IRM), en donde el agente detectable puede ser, por ejemplo y sin limitación, gadolinio, nanopartículas de óxido de hierro y nanopartículas de hierro-cobalto recubiertas de carbono aumentando de este modo la sensibilidad de la IRM para la detección de placas.

El anticuerpo o el fragmento del mismo puede estar unido a la molécula de carga usando cualquier método conocido en la materia (tecnología recombinante, conjugación química, quelación, etc.).

La presente invención también proporciona un método *in vivo* de detección de tumores, que comprende:

a) administrar a un sujeto el anticuerpo o el fragmento del mismo descrito en el presente documento enlazado a

- 25 un agente de diagnóstico; y
  - b) detectar la unión del anticuerpo o del fragmento del mismo.

En el método *in vivo* tal como se describe anteriormente, el agente de diagnóstico puede ser un radioisótopo, un marcador paramagnético, un fluoróforo, un fluorocromo de infrarrojo cercano (NIR, del inglés *Near Infra-Red*) o tinte,
un marcador de afinidad, o una molécula detectable basada en proteína mediante fusión genética al anticuerpo u otro agente adecuado tal como se describe anteriormente. En el método ya descrito, la etapa de detección (etapa b)) se puede llevar a cabo mediante cualquier método de obtención de imágenes apropiado, incluyendo, pero sin limitación, obtención de imágenes ópticas no invasiva, ultrasonido, IRM, PET o SPECT u otro método adecuado. En el método tal como se describe anteriormente, la detección de la acumulación del agente de obtención de imagen
molecular/anticuerpo indica la presencia y la localización de un tumor en el sujeto.

La presente invención también proporciona un método de diagnóstico de tumores in vitro, que comprende:

- a) poner en contacto una muestra tumoral con el anticuerpo aislado o purificado o un fragmento del mismo unido
- a un agente de diagnóstico, tal como se describe en el presente documento; y
- b) detectar la unión del anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo.

En el método *in vitro* tal como se describe anteriormente, el agente de diagnóstico puede ser un tinte fluorescente o una enzima; por ejemplo, y sin desear ser limitante de ningún modo, el agente de diagnóstico puede ser FITC o puede ser una fusión genética del anticuerpo aislado o purificado o del fragmento del mismo con proteína fluorescente verde mejorada (EGFP). En el método ya descrito, la etapa de detección (etapa b)) se puede llevar a cabo mediante obtención de imágenes de fluorescencia, inmunohistoquímica u otro método adecuado.

- En el método *in vitro* tal como se describe anteriormente, la detección de acumulación de agente de obtención de imagen molecular/anticuerpo indica que el tumor expresa CEACAM6. Por ejemplo, y sin desear ser limitante de ningún modo, una vez que se ha confirmado que un tumor expresa CEACAM6, se pueden usar terapias anti-CEACAM6 (tales como las descritas en el presente documento) para tratar al sujeto.
- La presente invención también proporciona un método de bloqueo de CEACAM6 y disminuye su invasión; de reducción de la proliferación celular, de la invasión y de la actividad de MPM-9; y de reducción de la capacidad de las células tumorales para promover la angiogénesis. El método comprende la administración de 2A3, 2A3-Fc o una combinación de los mismos a un sujeto que lo necesite.
- Los sdAb contra CEACAM6 son candidatos para el desarrollo de fármacos basados en anticuerpos contra cáncer de páncreas y otros cánceres. Los sdAb 2A3 y 2A3-Fc pueden bloquear el antígeno CEACAM6 y disminuir su invasión. El tratamiento de las células tumorales BxPC3 con 2A3 o 2A3-Fc reduce la proliferación celular, la invasión y la actividad de MPM-9. Tal tratamiento también reduce la capacidad de los medios acondicionados de las células tumorales pancreáticas para promover la angiogénesis de células HUVEC. Una ventaja de estos anticuerpos sobre los fármacos usados para la quimioterapia es que son más específicos para tumores que sobreexpresan el antígeno CEACAM6. Por lo tanto, esto puede dar como resultado una reducción de toxicidad celular general y de
- quimiorresistencia a células cancerosas. Además, los anticuerpos de un solo dominio tales como 2A3 son conocidos

por poseer estabilidad; presentan facilidad en el diseño de anticuerpos; y tienen una capacidad de penetración de tejidos superior debido a su pequeño tamaño. La versión fusionada a Fc (2A3-Fc) es también ventajosa para su larga semivida en circulación, y su capacidad para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento.

5

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos solamente tienen fines ilustrativos, y de ningún modo deben usarse como límites del alcance de la presente invención.

10 Ejemplo 1: Cultivo celular

Las células A549 de carcinoma pulmonar microcítico humano, las células LS174T de cáncer de colon humano, y las células BxPC3 de cáncer de páncreas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC), y las células JM01 de cáncer de mama murino se obtuvieron del Dr. M. O'Connor (National Research Council of Canada,

- 15 Montreal, Canadá); las células se cultivaron en los medios DMEM, EMM, RPMI, DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectivamente, se complementaron con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Roche). La línea celular IM-SCC-22B de carcinoma escamoso de cabeza y cuello humano se obtuvo de la Universidad de Michigan y se mantuvo en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) y glutamina al 1 %. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, del inglés *Human umbilical vein endothelial cells*) se obtuvieron de Invitrogen y se
- 20 cultivaron en Medio 200 (Invitrogen) complementado con FBS inactivado de complemento al 15 % y suplemento de crecimiento bajo en suero al 2 % (Invitrogen). Todos los medios de cultivo celular contenían 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células se cultivaron a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % en placas de microtitulación de 6 pocillos durante 24 horas. Para la tinción inmunocitoquímica (Ejemplo 8), las células se cultivaron sobre cubreobjetos esterilizados en placas de microtitulación de 6 pocillos durante el 80 %
- 25 de confluencia.

30

35

45

55

#### Ejemplo 2: Aislamiento de sdAb

Los anticuerpos de un solo dominio (sdAb) se generaron mediante inmunización de una llama y su posterior aislamiento.

Se inmunizó una llama (*Llama glama*) cinco veces (días 1, 21, 35, 49 y 63) por vía subcutánea con 1 x10<sup>7</sup> células completas de cada una de las cuatro líneas celulares del Ejemplo 1. Se aplicó adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund y ningún adyuvante en la primera, en la segunda a la cuarta, y en la quinta inmunización, respectivamente. En los días 1, 22, 36, 49, 64 y 71, se tomaron 50 ml de sangre a partir de la cual se aislaron los sueros y los linfocitos de sangre periférica. Se observó una respuesta inmunitaria específica de antígeno

- aislaron los sueros y los linfocitos de sangre periférica. Se observó una respuesta inmunitaria específica de antígeno contra CEACAM6 tanto en el día 49 como en el día 71 en comparación con el nivel preinmunológico (Figura 1A), a pesar del hecho de que nunca se usó para la inmunización de la llama CEACAM6 recombinante purificada.
- 40 Se extrajo ARN de los linfocitos de sangre periférica usando el Mini Kit de ARN sanguíneo QIAamp (Qiagen, Mississauga, ON). Se sintetizó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc de primera hebra (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC). Los cebadores "MJ1.2.3 Back"

MJ1:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCSMKGTGCAGCTGGTGGAKTCTGGGGGA-3' (SEQ ID NO:9)

MJ2:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGGA-3' (SEQ ID NO:10)

MJ3:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGCTCAGGTACAGCTGGTGGAGTCT-3' (SEQ ID NO:11)

50 y " $CH_2$  +  $CH_2b_3$ " (descritos en otra parte (Doyle et al, 2008))

CH<sub>2</sub>:5'-CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3' (SEQ ID NO:12)

#### CH<sub>2</sub>b<sub>3</sub>:5'-GGGGTACCTGTCATCCACGGACCAGCTGA-3'(SEQ ID NO:13)

se usaron para amplificar los dominios variables tanto de V<sub>H</sub>H (600 pb) como de V<sub>H</sub> (900 pb). Estos dos fragmentos se separaron en gel de agarosa y el fragmento V<sub>H</sub>H se purificó a partir del gel. Una PCR anidada usando los cebadores MJ7 y MJ8 (Doyle et al, 2008)

60 MJ7:5'-CATGTGTAGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC-3' (SEQ ID NO:14)

#### MJ8: 5'-CATGTGTAGATTCCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACCTGG-3' (SEQ ID NO:15)

se realizó para amplificar todos los genes de V<sub>H</sub>H. Los fragmentos finales de la PCR se unieron en el vector
 fagémido pMED1 (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009) usando los sitios de restricción *Sfil*. El vector ligado se usó para transformar células *E. coli* electrocompetentes (TG1).

El repertorio de V<sub>H</sub>H se expresó sobre el fago tras ser rescatado con el fago auxiliar M13K07. Los V<sub>H</sub>H específicos contra CEACAM6 se enriquecieron mediante dos rondas de selección in vitro sobre placas de microtitulación recubiertas con el antígeno, el dominio N-terminal de CEACAM6 (10 µg/ml). La unión de las partículas de fago que llevan V<sub>H</sub>H específicos se realizó en competencia de 100 µg/ml de ES1 (el pentacuerpo del sdAb anti-CEACAM6,

- 5 AFAI; Zhang et al, 2004a). Se usó trietilamina 100 mM (a pH 11,0) para eluir las partículas de fago unidas que se neutralizaron inmediatamente con Tris-HCl 1 M (a pH 7,4) y se usaron para infectar de manera espontánea células TG1 en crecimiento. Para evaluar el enriquecimiento de las partículas de fago que llevan  $V_H Hs$ , específicos de antígeno, se usó una dilución seriada de los fagos eluidos de los pocillos recubiertos con antígeno frente a los no recubiertos para transfectar las células TG1 de crecimiento exponencial.
- 10

15

20

25

Las colonias individuales obtenidas tras la segunda ronda de selección se ensayaron frente a CEACAM6 en un fago-ELISA. Brevemente, los clones se cultivaron en 2 x medio YT + ampicilina (100 mg·ml<sup>-1</sup>) + medio de glucosa al 0,1 % a una DO<sub>600</sub> = 0,3 - 0,5 y se infectaron con el fago auxiliar M13K07 (a 37 °C sin agitación, durante 30 minutos) seguido por la adición de Kanamicina (50 µg ml<sup>-1</sup>) y la amplificación durante toda la noche (a 37 °C con agitación). Se centrifugaron los cultivos (a 4000 rpm, durante 20 min, a 4 °C) para sedimentar las células. Posteriormente se añadieron 100 µl de sobrenadante que contiene partículas recombinantes de fago a los pocillos de la placa de microtitulación recubierta previamente. Después de 2 h de incubación a 37 °C, los pocillos de la placa de microtitulación se lavaron tres veces con PBST seguido por la adición de anti-M13 conjugado con HRP (1:5000). Los V<sub>H</sub>H-fagos unidos a CEACAM6 se detectaron mediante la adición de 100 µl de sustrato HRP (KDL) para una incubación de 15 minutos y la reacción se detuvo usando H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y se midió la absorción a 405 nm.

Los V<sub>H</sub>H clonados en el vector fagémido pMED1 y transformados en *E. coli* produjeron una biblioteca de V<sub>H</sub>H con 5 x 10<sup>8</sup> transformantes independientes y tasas de inserción del 85 %, dando un tamaño de biblioteca funcional de 4,3 x 10<sup>8</sup>. Esta biblioteca se usó para seleccionar sdAb de unión a CEACAM6 tal como se describen (Els Conrath et al, 2001) con la excepción de que solo se realizaron dos rondas de selección en presencia de 100 µg/ml de ES1 (el pentacuerpo del sdAb anti-CEACAM6, AFAI; Zhang et al, 2004a). La adición de ES1 se hizo para evitar el aislamiento del sdAb AFAI, y también para eliminar la oportunidad de que se aíslen anticuerpos de baja afinidad.

El fago que se une específicamente a CEACAM6 se enriqueció de manera significativa tras las dos rondas de 30 selección, (Figura 1B). Cuarenta y ocho clones tomados de manera aleatoria se ensayaron sobre fago-ELISA para identificar aquellos que presentan sdAb específicos de CEACAM6, de los cuales, 18 salieron positivos. Esto se puede deber a las rigurosas condiciones de lavado aplicadas durante la selección. La secuenciación de ADN reveló que el sdAb presentado en estos clones era siempre el mismo y se denominó 2A3 (Figura 1C). El sdAb 2A3 posee las sustituciones de aminoácidos características de V<sub>H</sub>H en el marco 2 (Val37Phe, Gly44Glu, Leu45Arg y Trp47Xaa, en numeración de Kabat (Kabat et al, 1991a). La sustitución común de Leu11Ser de V<sub>H</sub>H de camélido no se ve en 35 2A3.

### Ejemplo 3: Expresión de sdAb

40 El sdAb 2A3 (Ejemplo 2) se subclonó en un vector de expresión para la producción y la purificación de proteínas. El sdAb 2A3 diseñado genéticamente incluye el péptido señal ompA así como los marcadores c-myc y His, y comprende la secuencia:

> MKKTAIAIAVALAGFATVAQAQPAMAQVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCRTSGRT NSVYTMGWFRQAPGKEREFVAQIMWGAGTNTHYADSVKGRFTISRDSAESTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAANRGIPIAGRQYDYWGQGTQVTVSSGQAGQGSEQKL ISEEDLNHHHHHH (SEQ ID NO:16)

- 45
- El sdAb 2A3 se subclonó en el vector de expresión pMED2 (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009) usando la enzima de restricción Sfil. Tras la confirmación de la secuencia, los sdAb recombinantes se expresaron como proteína marcada por 6 x His en el periplasma y purificada por IMAC usando una columna Ni-NTA. Brevemente, los clones se inocularon en 25 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C con 200 rpm y agitación durante toda la noche. Se transfirieron 20 ml del cultivo a 1 l de medio M9 (glucosa al 0,2 %, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,6 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 0,3 %, 50 NH₄Cl al 0,1 %, NaCl al 0,05 %, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM) complementado con casaminoácidos al 0,4 %, 5 µg/ml de vitamina B1 y 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante 24 horas. Se añadieron 100 ml de nutrientes de TB a 10 x (Triptona al 12 %, extracto de levadura al 24 % y glicerol al 4 %), 2 ml de 100 µg/ml de ampicilina y 1 ml de isopropil-beta-D-Tiogalactopiranósido (IPTG) 1 M al cultivo y la incubación continuó durante otras 65-70 horas a 28 °C con una velocidad de agitación de 200 rpm. Las células se centrifugaron después y los sedimentos se lisaron con 55 lisozima. Los lisados celulares se centrifugaron y los sobrenadantes se cargaron sobre 5 ml en columnas de afinidad
- de HP por quelación HiTrap™ (GE Healthcare). Tras el lavado de las columnas con cuatro volúmenes de columna de solución de lavado (HEPES 10 mM que contiene NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, a pH 7,5), Las proteínas marcadas con His se eluyeron con un gradiente lineal (de 2,5 a 500 mM) de imidazol y las proteínas eluidas se 60 sometieron a diálisis en tampón de PBS.

El protocolo de purificación de una etapa descrito anteriormente dio como resultado una proteína con una pureza de más del 95 % cuando se evaluó con SDS-PAGE (datos no mostrados). El rendimiento de la producción fue de 25 mg de proteína purificada por litro de cultivo bacteriano. Como la mayoría de los sdAb de camélido, 2A3 existe como un monómero puro visto como un único pico en una cromatografía por exclusión de tamaño usando una columna Superdex75 (Figura 2).

El sdAb 2A3 se clonó en el vector de expresión en mamíferos pTT5 (Durocher y Perret, 2002) que contiene el fragmento Fc2b de ratón (Figura 1D); la proteína 2A3-Fc resultante se expresó y se purificó tal como se describe anteriormente (Zhang et al, 2009a; 2009b). Brevemente, las células 293-6E se cultivaron en 293-SFM (Invitrogen, Burlington, ON) después se transfectaron con las construcciones de pTT5 usando PEI como un agente de transfección. Se dejó que las células transfectadas creciesen durante 5 días en medio F17 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio de cultivo celular se recolectó mediante centrifugación y después el medio se filtró usando una membrana de 0,22 micrómetros para eliminar los restos celulares. El 2A3-Fc se purificó usando una columna de proteína G (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se obtuvieron más de 30 mg de proteína con más del 95 % de pureza

15 por litro de cultivo (Fig. 3).

5

10

25

30

### Ejemplo 4: Caracterización biofísica de sdAb

Se determinó el perfil de dicroísmo circular (DC) y la termoestabilidad del anticuerpo sdAb 2A3 producido en el Ejemplo 3.

La pureza de las proteínas y su formación de agregados o ausencia de los mismos se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño Superdex<sup>™</sup> 75 10/300GL (GE Healthcare) usando un sistema ÄKTA FPLC<sup>™</sup> (GE Healthcare). Las proteínas se separaron con una SEC (siglas del inglés *size exclusion chromatography*, cromatografía por exclusión de tamaño) Superdex<sup>™</sup> 75 en tampón fosfato 10 mM, a pH 7,0. Se registró el pico de 2A3, y se usó la proteína para el análisis de DC. Se registraron los espectros de DC de 250 a 200 nm a concentraciones de proteína de 2,5 µM en una cubeta de cuarzo de 10 mm con un espectrómetro de DC J-850 (JASCO, Easton, MD). Los datos se registraron con un ancho de banda de 1,0 nm y una velocidad de exploración de 50 nm/min con dos acumulaciones de exploraciones para determinar el perfil DC del perfil. En las mismas condiciones pero con una sola acumulación de datos, se midieron de forma automática los espectros de DC a intervalos de 2 °C de 25 a 91 °C para determinar la desnaturalización térmica de la proteína a una velocidad de cambio de temperatura de 1 °C/min. Se representó la elipticidad a 217 nm frente a la temperatura y se calcularon las T<sub>m</sub> a partir de la ecuación sigmoidal de Boltzmann usando el programa informático GraphPadPrism.

35 Se midió el perfil de dicroísmo circular (DC) de 2A3 para estimar la estructura secundaria y la termoestabilidad del sdAb. 2A3 tenía el típico perfil de DC de los anticuerpos de un solo dominio (Figura 4A). La desnaturalización termoinducida de la proteína se midió en el intervalo de temperaturas de 25 a 91 °C con intervalos de 2 °C. La representación del valor de DC a 217 nm frente a la temperatura sugirió una desnaturalización de dos fases (Figura 4B) con una temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) calculada de 74 °C.

#### Ejemplo 5: ELISA de fase sólida de sdAb

El sdAb 2A3 del Ejemplo 3 se evaluó adicionalmente en su capacidad para conservar su capacidad de unión en el suero.

45

Las placas de microtitulación de 96 pocillos Maxisorb (Nunc) se recubrieron con 2 µg/ml de proteína recombinante CEACAM6 (dominio N) durante toda la noche a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se usó una solución de leche en polvo desnatada al 2 % en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión a proteína residual en los pocillos. Se añadió suero diluido de forma seriada o sdAb recombinante

- 50 soluble a los pocillos, que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La detección de las IgG y los sdAb de la llama se realizó mediante IgG anti-llama de cabra (Bethyl Lab, Montgomery, TX), conjugado de anti-cabra con peroxidasa de rábano picante (Cerdarlane, Burlington, ON) y el correspondiente sustrato KPL para peroxidasa. La reacción se detuvo añadiendo H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y se midió la absorción a 405 nm.
- 55 El sdAb se incubó en suero de ratón y la capacidad de unión residual se midió mediante ELISA y después se comparó con el mismo anticuerpo que no se había incubado en suero. El resultado (Figura 5A) demostró que 2A3 conservaba su capacidad de unión completa en esta condición, lo que sugiere que bien el sdAb solo o los anticuerpos construidos a partir del mismo serían resistentes a la proteolisis provocada por proteasas séricas una premisa para su aplicación *in vivo*.

#### Ejemplo 6: Medición de la afinidad de sdAb

Se determinaron las afinidades del sdAb de 2A3 y de 2A3-Fc del Ejemplo 3 así como del anticuerpo 9A6 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) por el dominio N de CEACAM6 con resonancia de plasmón superficial (SPR).

65

La unión del sdAb 2A3 a CEACAM6 se determinó mediante SPR usando un Biacore 3000 (GE Healthcare). Se inmovilizaron 209 UR de CEACAM6 y 1746 UR de ovoalbúmina (como proteína de referencia) sobre microplaca sensorial de grado de investigación CM5 (GE HealthCare). Las inmovilizaciones se realizaron con un kit de acoplamiento a amina (GE Healthcare) y se llevaron a cabo a 50 µg/ml de CEACAM6 en acetato 10 mM, a pH 4 (GE Healthcare) y 50 µg/ml de ovoalbúmina en acetato 10 mM, a pH 4,5. Se invectaron 120 µl del sdAb a una

- 5 Healthcare) y 50 µg/ml de ovoalbúmina en acetato 10 mM, a pH 4,5. Se inyectaron 120 µl del sdAb a una concentración de 1 nM a 60 nM sobre las superficies a un caudal de 40 µl/min. Los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente en HBS-EP, en HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005 % (GE Healthcare). La regeneración se realizó con tampón de funcionamiento (HBS-EP). Los datos se analizaron con el programa informático BIAevaluation 4.1.
- 10

De forma similar, se determinaron las afinidades de unión de los anticuerpos 9A6 y 2A3-Fc usando un Biacore 3000 (GE Healthcare). Se inmovilizó un total de 2179 unidades de resonancia (UR) de 2A3-Fc, 4438 UR de 9A6 y 3745 UR de ovoalbúmina sobre una microplaca sensorial de grado de investigación CM5 (GE HealthCare). Se inyectaron ciento veinte microlitros de proteína recombinante CEACAM6 a una concentración de 0,1 nM a 200 nM sobre las

- 15 superficies a un caudal de 40 μl min<sup>-1</sup>. Se llevaron a cabo análisis a temperatura ambiente en HBS-EP que comprende HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005 % (GE Healthcare). La regeneración se realizó con HBS-EP usado como tampón de funcionamiento. Los datos se analizaron usando el programa informático BIAevaluation 4.1.
- La inyección de 2A3 en la superficie acoplada a CEACAM6 reveló la unión específica de sdAb al antígeno. Las curvas reales de asociación y de disociación se adaptan bien al modelo de unión de Lagmuir 1:1, dando una tasa de asociación (k<sub>a</sub>) de 1,1 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, una tasa de disociación (k<sub>d</sub>) de 5,3 x 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>, y una constante de disociación (K<sub>D</sub>) de 4,7 x 10<sup>-9</sup> M (Figura 5B). Las constantes de afinidad (K<sub>D</sub>) para 9A6 y 2A3-mFc fueron de 8 nM y de 13 nM, respectivamente (Figura 5C)

### Ejemplo 7: Mapeo de epítopos

El mapeo de epítopos se realizó usando CEACAM6 y el sdAb 2A3 producido en el Ejemplo 3.

- 30 Se sintetizó una matriz de péptido para el dominio N-terminal de la secuencia de la proteína CEACAM6 mediante JPT (Berlín, Alemania). Se sintetizó un total de 45 péptidos de 15 aminoácidos de longitud y 10 aminoácidos solapantes. Se hizo un sondeo de la membrana de la matriz de péptidos con el sdAb 2A3 y después se detectó con anticuerpo anti-llama de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- 35 El sondeo de la membrana de la matriz de péptido con el anticuerpo 2A3 reveló 2 puntos específicos (péptidos) que presentaban unión del anticuerpo. La secuencia común (compartida) para estos péptidos es NRIGYSWYKG (SEQ ID NO:7; Figura 5D) que sería parte del bucle BC y parte de la hebra C basándose en la estructura publicada del dominio N de hCEACAM1 (Fedarovich et al, 2006).
- 40 Ejemplo 8: Tinción inmunohistoquímica y citometría de flujo con sdAb

El aislamiento de sdAb 2A3 específico de CEACAM6 y su caracterización bioquímica se llevó a cabo usando CEACAM6 recombinante expresada en *E. coli*. Se examinó si 2A3 y 2A3-Fc se unen a CEACAM6 expresado en mamíferos.

Para la tinción inmunocitoquímica, las células del Ejemplo 1 cultivadas sobre el cubreobjetos se fijaron en primer lugar en formaldehído al 10 % en PBS durante 10 minutos. Tras lavar las células con PBS, se añadió leche desnatada al 2 % en PBS en las cámaras y se permitió la incubación durante 2 horas para bloquear uniones no específicas. Tras lavar la solución de bloqueo, se incubaron las células con sdAb marcado con FITC. La tinción para el recuento se realizó con DAPI (0,1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, Invitrogen). Tras la inmunotinción, los cubreobjetos se montaron usando

50 el recuento se realizó con DAPI (0,1 μg ml<sup>-1</sup>, Invitrogen). Tras la inmunotinción, los cubreobjetos se montaron usan el kit Prolong Antifade (Invitrogen) y se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

Para la citometría de flujo, los sdAb purificados se marcaron con FITC tal como indica el fabricante (Invitrogen). Se cultivaron diferentes líneas celulares como una monocapa hasta que tuvieron aproximadamente el 80 % de confluencia. Tras la fijación con formaldehído al 10 % en PBS durante 10 minutos, las células se lavaron con PBS, luego se incubaron a temperatura ambiente con diferentes sdAb marcados con FITC. Tras una hora de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar los sdAb no unidos y se analizaron las células mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo de FACS Canto (BD Bio-sciences).

60 El análisis por transferencia de Western frente a CEACAM6 recombinante expresado en mamíferos usando 2A3 como el anticuerpo (Figura 6A) muestra claramente que 2A3 reconoció la proteína; por tanto, la CEACAM6 expresada en mamíferos se asemeja más a la CEACAM6 natural que a la expresada por *E. coli*. Además, en el mismo análisis por transferencia de Western, 2A3 presentó una clara unión al lisado total de las células BxPC3, lo que confirma su unión a la proteína natural (Figura 6A).

65

Para la tinción inmunocitoquímica, se incubó 2A3 marcado con FITC con células BxPC3 de tumor de páncreas fijadas con formaldehído. FITC-2A3 presentó una fuerte tinción para prácticamente cada célula BxPC3 (Figura 6B). 2A3 también se une a otras líneas de células tumorales tales como la línea LS174T de cáncer colorrectal y la línea A549 de células de carcinoma pulmonar no microcítico, ambas a menor intensidad y a pocas células (datos no

5 mostrados). Se obtuvieron resultados similares cuando se usó la citometría de flujo para analizar la unión. Mientras que aproximadamente el 90 % de las células BxPC3 tuvieron tinción positiva con 2A3, solo aproximadamente el 16 % de las células LS174 y el 20 % de las células A549 tuvieron tinción positiva (Figura 6C).

En resumen, las células BxPC3 tuvieron altos niveles de expresión que se detectaron mediante análisis por transferencia de Western de los lisados celulares, por análisis FACS y por tinción inmunohistoquímica (Figura 7). Sin 10 embargo, no se detectó expresión de CEACAM6 en las HUVEC o en los medios de cultivo de células de ningún tipo (Figura 7B).

### Ejemplo 9: Ensayo del MTT in vitro con sdAb

15

Como la CEACAM6 está involucrad en la progresión del tumor y sdAb 2A3 es una molécula de unión de alta afinidad a CEACAM6 expresada sobre la superficie celular, se evaluó el efecto de este sdAb y de la construcción 2A3-Fc sobre la proliferación celular en un ensayo in vitro del MTT.

- Se evaluó el efecto de sdAb 2A3 y de 2A3-Fc sobre la proliferación y la viabilidad celular mediante un ensavo de 20 proliferación (Mosmann et al, 1983) usando bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (reactivo MTT, Sigma Aldrich); en algunos experimentos, se usó VTI1-Fc como control negativo. Las células BxPC3, A549 y LS174 se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) a una densidad de 5.000 células/pocillo, y se añadió 125 µg/ml de anticuerpo (2A3 como el sdAb de ensayo, y BSA12 (Li et al, 2009) como un sdAb de control
- 25 irrelevante) a las células 24 horas más tarde. Se dejó que las células creciesen durante 72 horas en presencia del sdAb, y después se ensayó su viabilidad. Brevemente, se añadieron a cada pocillo 20 µl de reactivo MTT (2 mg/ml en PBS). Después de cuatro horas, se eliminó el sobrenadante, las células adherentes se lisaron y los cristales se solubilizaron con 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) por pocillo. Se midió la absorbancia del producto formazán con un lector de placa a una longitud de onda de 570 nm. Tras restar la absorbancia de fondo, se 30 expresaron los resultados como absorbancia.
  - Las líneas celulares BxPC3, A549 y LS174 se eligieron como modelos celulares debido a sus diferentes niveles de expresión de CEACAM6. La proliferación de células BxPC3 tal como se midió mediante MTT presenta una diferencia significativa (p < 0,0001) entre células tratadas con BSA12, un sdAb irrelevante (Li et al, 2009) y sdAb 2A3 (Figura 8Å), lo que sugiere que 2A3 inhibe la proliferación in vitro de BxPC3. En cambio, la adición de 2A3 al cultivo de
- 35 células A549 y LS174 tuvo poco efecto sobre su crecimiento (Figura 8B). Dado que estas dos últimas líneas celulares tuvieron niveles de expresión de CEACAM6 más bajos, la capacidad de inhibición del crecimiento diferencial para las diferentes células puede depender de los niveles de expresión de antígeno.
- 40 La inhibición de la proliferación celular de BxPC3 por 2A3-Fc, junto con 2A3, también se ensayó mediante ensayo del MTT. El anticuerpo 2A3 a 50 µg/ml inhibió aproximadamente el 27 % de la proliferación celular al contrario que el control del medio de inanición (Figura 9A). También se ensayó el efecto de inhibición de 2A3-Fc a una concentración de 360 µg/ml, que es la concentración molar equivalente a 50 µg/ml de 2A3. 2A3-Fc tuvo un mejor efecto de inhibición, inhibiendo el 55 % de la proliferación de células BxPC3. 45

### Ejemplo 10: Ensayo in vitro de la actividad de MPM-2 y MMP-9 mediante zimografía en gelatina

La zimografía en gelatina se usa para detectar la actividad de las gelatinasas, concretamente, las metaloproteinasas de matriz MPM-2 y MPM-9 (28). Los anticuerpos 2A3 y 2A3-Fc del Ejemplo 3 se usaron para evaluar su influencia 50 sobre la actividad de MPM-2 y MPM-9.

Brevemente, se obtuvieron medios acondicionados de cultivos de células BxPC3 que se habían tratado con anticuerpo 2A3 o 2A3-Fc, o con gemcitabina. Se tomaron alícuotas del medio de cultivos de BxPC3 en el momento en el que se realizaron los ensayos de proliferación (Ejemplo 9). Para la evaluación del efecto de dependencia de la

- 55 dosis, se usaron anticuerpos y gemcitabina a concentraciones de 0,4-25 µM y 0,4-50 nM, respectivamente. Los medios se aplicaron a un gel de electroforesis de dodecilsulfato de sodio al 10 % - gel de poliacrilamida que se había complementado con 1,5 mg/ml de gelatina. Se dejó correr el gel a 150 V hasta que el colorante azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel. Se eliminó el SDS del gel mediante el lavado del gel cuatro veces con Triton X-100 al 2,5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave usando un agitador orbital (28). El gel se
- incubó después durante toda la noche a 37 °C en tampón de desarrollo que comprende Tris-HCL 50 mM, NaCl 0,2 60 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 5 mM, Brij-35 al 0,02 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 % a pH 7,4. Los geles complementados con gelatina y digeridos por gelatinasa se tiñeron con azul de Coomassie. Las bandas claras producidas por la actividad de MPM-2 y MPM-9 fueron visibles frente al azul de fondo tras la destinción. Las actividades relativas de las gelatinasas se determinaron usando un densitómetro (AlphaView, FluorChem SP, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA,
- 65 Estados Unidos).

Los resultados indican que tanto 2A3 como 2A3-Fc fueron capaces de reducir la actividad de MPM-9, pero no la actividad de MPM-2 (Figura 9B). La dependencia de la dosis de la inhibición de la proliferación de células BxPC3 y la actividad de MPM-2 o MPM-9 se investigó después; también se ensayó el efecto de la gemcitabina. Los anticuerpos 2A3 / 2A3-Fc y la gemcitabina disminuyeron la proliferación de las células BxPC3 a menos del 10 % a dosificaciones de 25 µM y 50 nM, respectivamente.

Las CI50 para 2A3, 2A3-Fc y gemcitabina se determinaron como 6,5 µM, 8 µM y 12 nM, respectivamente (Figura 10A).

- 10 Los anticuerpos anti-CEACAM6 regularon negativamente la actividad de MPM-9, pero no la actividad de MPM-2 en las células BxPC3 (Figura 10B). La actividad MPM-9 del medio de cultivo de BxPC3 tratadas con 2A3 se reguló negativamente al 33 % en comparación con las células no tratadas (Figura 10B). La gemcitabina disminuyó la proliferación de las células BxPC3 de manera más eficaz de lo que lo hizo el sdAb. Sin embargo, este efecto se debió a la toxicidad celular - no disminuvó el nivel de MPM-9. En su lugar, se detectó un ligero aumento de la actividad de MPM-9 para las células BxPC3 que se trataron con gemcitabina. 15
  - Aunque la gemcitabina afecta profundamente a la supervivencia de las células, no afecta a la actividad de MPM-2 ni de MPM-9 en células BxPC3. El efecto de la gemcitabina sobre MPM-2 y MPM-9 fue similar al que se anotó en informes previos (Hag et al, 2000; Kunnumakkara et al, 2010). En el presente caso, además de inhibir la proliferación
- celular, se reguló negativamente la actividad de MPM-9 en el medio de cultivo bloqueando CEACAM6 sobre la 20 superficie de BxPC3 usando 2A3 y 2A3-Fc anti-CEACAM6. Una dosificación de 5 µM de sdAb 2A3 redujo la actividad MPM-9 a aproximadamente el 25 %, pero no influyó de manera significativa en la actividad de MPM-2. Por otra parte, el sdAb 2A3 redujo la invasión de BxPC3 en aproximadamente el 73 %. Excepto para su efecto de toxicidad en células, la gemcitabina no afectó a la angiogénesis o a la invasión; incluso aumentó ligeramente la 25 actividad de MPM-2/MPM-9 (aproximadamente el 10 %) a altas dosis.

#### Ejemplo 11: Ensayo de invasión en matrigel

5

30

El ensayo de invasión en matrigel está diseñado para evaluar la capacidad de las células para invadir el matrigel, un indicativo de la capacidad para metastatizar.

El ensayo se llevó a cabo usando cámaras de invasión de Matrigel biocubiertas (BD Biosiciences, Bedford, MA). Cada cámara comprendió una membrana PET de tamaño de poro de 8 µm, que tenía una capa fina basal de Matrigel. Solo las células que pudiesen digerir la matriz podrían migrar a través de los poros. Las células BxPC3 35 cultivadas en medio de inanición (RPMI 1640 con FBS al 0,1 %) en presencia (tratadas) o ausencia (no tratadas) de 40 µM de 2A3 o 2A3-Fc se despegaron con tampón de disociación de células (Invitrogen), después se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en medio RPMI y se cultivaron en las partes superiores de los pocillos de inserción a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo y se cultivaron a 37 °C en una cámara humidificada de CO2. Después de 20 h, las células no invasivas se retiraron por frotación de la parte superior del 40 pocillo de inserción usando un bastoncillo de algodón. Las células invasivas sobre la parte inferior se tiñeron con Calceína AM (Invitrogen) y se fotografiaron con un microscopio Olympus BX51. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Las células BxPC3 fueron capaces de degradar el matrigel y de migrar a través de la membrana basal. Se redujo la invasión en células BxPC3 que se trataron con anticuerpo 2A3 o 2A3-Fc anti-CEACAM6, en comparación con las 45 células de control (no tratadas) (Figura 11A). La invasión de las células que se trataron con 2A3 o 2A3-Fc disminuyó al 27,4 % (27,4 ± 8,4 % y 27,4 ± 4,8 %, respectivamente) (Figura 11B). Por tanto, la invasión de las células cancerosas BxPC3 se puede modular mediante el direccionamiento de CEACAM6 usando el anticuerpo 2A3 o 2A3-Fc. 50

#### Ejemplo 12: Ensayo in vitro de formación de capilares

La angiogénesis es otra etapa importante en la progresión del cáncer de páncreas. Los microvasos densos y relativamente complejos se localizan en el tejido de cáncer de páncreas. Los tumores altamente vascularizados se 55 asocian con un elevado riesgo de metástasis hepática y una mala tasa de supervivencia (Semenza, 2003). La antiangiogénesis es una estrategia válida cuando se emplea una terapia dirigida al cáncer de páncreas. Por tanto, se usó el ensayo in vitro de formación de capilares para ensayar la capacidad de los medios acondicionados de células BxPC3 tratadas con sdAb para inhibir la angiogénesis de las HUVEC.

- 60 Aproximadamente 200 µl de la matriz de la membrana basal del factor de crecimiento reducido Geltrex (Invitrogen) se colocaron en un pocillo de inserción de cultivo celular de 9 mm de diámetro que tenía un tamaño de poro de 0,45 µI (Millipore, Billerica, MA). La matriz se polimerizó después a 37 °C durante 30 minutos. Los medios acondicionados obtenidos a partir de células BxPC3 tratadas con anticuerpo 2A3 o 2A3-Fc durante 24 horas se recogieron y se usaron para resuspender las HUVEC a 1x10<sup>5</sup> células/ml. Las células HUVEC se cultivaron entonces en la matriz polimerizada a 5x10<sup>4</sup> células por pocillo. Las células se cultivaron a 37 °C durante 16 horas, después se tiñeron con 65
- Calceína AM (Invitrogen) durante 30 minutos. Se tomaron fotografías a un aumento de 100x empleando microscopía

de fluorescencia (Olympus Bx51). Se capturaron tres campos que se eligieron de manera aleatoria y se midieron las longitudes de los capilares en cada campo.

- Los resultados mostraron que la angiogénesis inducida por el tumor se suprimió de manera significativa cuando se 5 administró un medio de cultivo de BxPC3 tratado con 2A3 y 2A3-Fc (Figura 12). En este ensayo de formación de túbulos, los medios de células BxPC3 tratadas con 2A3 o 2A3-Fc disminuyeron de manera significativa la longitud total de los vasos (la actividad formadora de vasos se redujo en aproximadamente el 21 %; Figure 12A). El sdAb 2A3 inhibió el 21 % de la angiogénesis de células endoteliales; el 49 % de la angiogénesis se inhibió mediante 2A3-Fc. En cambio, los efectos inhibidores de la angiogénesis no se vieron cuando se usó medio de cultivo de células BxPC3 tratadas con gemcitabina (Figura 12B). Basándose en el informe en el que CEACAM6 desempeña un papel en la 10
- invasión y en la angiogénesis en el cáncer de páncreas, los resultados de los inventores sugieren que el papel de CEACAM6 en la invasión y en la angiogénesis en el cáncer de páncreas se puede bloquear mediante anticuerpos 2A3 o 2A3-Fc. Además, dado que los agentes antiangiogénicos permiten una mejor administración de gemcitabina en los espacios vasculares e intersticiales del tumor (Schwarz et al, 2009), los sdAb 2A3 y 2A3-Fc también pueden 15 tener tales funciones.

### Ejemplo 13: Tinción de inmunofluorescencia

- Los anticuerpos 2A3, 2A3.Fc y 9A6 se marcaron con Fluoresceína 5(6)-isotiocianato (FITC; Sigma-Aldrich), Se 20 disolvió FITC en dimetilsulfóxido anhidro inmediatamente antes de su uso, después se añadió a los anticuerpos con una proporción de 50 µg por mg de anticuerpo. La mezcla se incubó y se rotó a temperatura ambiente durante 60 minutos para la conjugación covalente. El FITC que no había reaccionado se eliminó mediante columna de PD-10.
- La inmunotinción tanto de células UM-SCC-22B negativas en CEACAM6 (control negativo) como de células BxPC3 25 positivas en CEACAM6 cultivadas in vitro, usando anticuerpos conjugados con FITC presentó una señal de fluorescencia fuerte en células BxPC3 con los tres anticuerpos (2A3, 2A3-Fc y 9A6). También, la mayoría de la señal fluorescente se localizó sobre la membrana celular, debido a la distribución en membrana del antígeno CEACAM6 (Figura 13A).
- 30 Se realizó la tinción de inmunofluorescencia in vitro de los tumores obtenidos de ratones establecido como un modelo de BxPC3 de cáncer de páncreas humano (véase el Ejemplo 14). Esto se hizo para demostrar que las células BxPC3, que crecen como un tumor en ratones, conservaban la expresión de CEACAM6 tras crecer en ratones. Brevemente, se tomaron muestras de tumor de los ratones que portan el tumor después de que el tumor alcanzase el tamaño de 100 mm<sup>3</sup>. Los cortes de tumor congelados (espesor de 5 µm) se fijaron con acetona fría
- 35 durante 10 minutos y se secaron al aire durante 30 minutos. Los cortes se enjuagaron con PBS durante 2 minutos y se bloquearon con suero de burro al 10 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones del tumor se tiñeron con los anticuerpos 9A6, 2A3 y 2A3-Fc marcados con FITC. Las secciones de tumor fijadas se incubaron después con los anticuerpos conjugados con FITC. Las secciones presentaron una fuerte tinción con anticuerpos anti-CEACAM6 (Figura 13D; datos no mostrados para 2A3), lo que demuestra que estos tumores conservaron la 40 expresión de CEACAM6 tras el crecimiento en ratones.

### Ejemplo 14: Obtención de imágenes por PET

En un modelo BxPC3 de cáncer de páncreas humano, que es conocido por expresar altamente CEACAM6, se 45 evaluó la farmacocinética y la administración al tumor de tres anticuerpos con diferentes tamaños y se comparó con imágenes de PET cuantitativa.

Marcaje de anticuerpos: El anticuerpo monoclonal 9A6 se encargó a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El sdAb 2A3 y el 2A3-Fc se produjeron tal como se describe en el Ejemplo 3. Los anticuerpos se marcaron después 50 con FITC (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) o DOTA (Macrocyclics; Dallas, TX) de acuerdo con los métodos documentados anteriormente, con pequeñas modificaciones (21-22). La proporción de reacción de DOTA frente a 9A6, 2A3-Fc y 2A3 fue 20:1, 10:1 y 2:1, respectivamente. Se diluyó <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> (74 MBq; National Institutes of Health) en 300 µl de tampón de acetato de sodio 0,1 M (a pH 6,5) y se añadieron a 50 µg de anticuerpos conjugados con DOTA. La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a 40 °C con agitación constante. Después se purificaron los

55 <sup>64</sup>Cu-DOTA-Ab mediante columna de PD-10 (GE HealthCare; Piscataway, NJ) usando PBS como la fase móvil. La formación de complejos de <sup>64</sup>Cu y de los anticuerpos conjugados se controló mediante radio-TLC (R<sub>f</sub> <sup>64</sup>Cu-DOTA-9A6 = 0,032, R<sub>f</sub> <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc = 0,076, R<sub>f</sub> <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3 = 0,090, R<sub>f</sub> <sup>64</sup>Cu= 0,779). La radio-TLC se realizó en un escáner AR-2000 Bioscan (Washington DC), usando placas de gel de sílice (LK6DF, 60 A, 200 mm, Whatman) y ácido etilenodiaminotetraacético al 1 % (EDTA), NH4OAc al 5 % en agua:metanol (1:1) como un disolvente de desarrollo. La Radio-TCL demostró la incorporación de más del 95 % para 9A6 y 2A3-Fc y el 50 % para 2A3. 60

Estudios de absorción y eflujo celular: La absorción en células, la internalización y el eflujo de <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc se realizaron con células tumorales BxPC3 y UM-SCC-22B (control negativo). Para la absorción en células, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células por pocillo y se incubaron con 18,5 kBq (0,5 uCi/5 ng)/pocillo de marcador marcado con <sup>64</sup>Cu a 37 °C durante 15, 30, 60 y 120 minutos. Las células se lavaron

65 después tres veces con PBS frío y se lisaron con 500 µl de NaOH 0,1 M. Para los estudios de eflujo, aproximadamente 18,5 kBq (0,5 µCi)/pocillo de <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-mFc se incubaron en primer lugar con células BxPC3 en placas de 24 pocillos durante 2 horas a 37 °C. Las células se lavaron tres veces con PBS frío y se permitió que se mantuviesen en tampón reciente. En diversos puntos temporales, se retiró el medio y se lavaron las células tres veces con PBS frío. Las células se lisaron después con 500 µl de NaOH 0,1 M. Se recogió el lisado celular y se midió la radiactividad restante en un contador y (Packard, Meriden, CT) La absorción en células y el

5 celular y se midió la radiactividad restante en un contador y (Packard, Meriden, CT). La absorción en células y el eflujo se expresaron como el porcentaje de la dosis añadida (%DA) tras la corrección de la disminución. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en pocillos.

A lo largo del tiempo, las células BxPC3 presentaron una elevada acumulación de radiactividad. Tras 2 horas de incubación, la absorción total fue del 10,13 ± 0,05 % de la dosis total añadida. Al mismo tiempo, las células casi no mostraron absorción de <sup>64</sup>Cu-DOTA-IgG. Las células 22B presentaron una absorción mucho menor de <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc en comparación con las células BxPC3 (Figura 13B y C). Estos resultados confirmaron la unión específica de <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc a las células BxPC3 mediante la reorganización de CEACAM6. Cuando las células marcadas se incubaron en un medio sin suero desprovisto de radiactividad, <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc presentó una lenta disociación y efluio desde las células con el tiempo (Figura 13B). Tras 2 horas de incubación más del 65 % de la radiactividad a ún

15 eflujo desde las células con el tiempo (Figura 13B). Tras 2 horas de incubación, más del 65 % de la radiactividad aún se conservaba en las células.

PET de animales pequeños y análisis de imagen: El modelo de tumor BxPC3 subcutáneo se estableció en ratones desnudos atímicos hembra de 5 a 6 semanas de vida obtenidos de Harlan (Indianapolis, IN); Se inyectaron 5x10<sup>6</sup> células suspendidas en 50 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se sometió a los ratones a estudios 20 de PET en animales pequeños cuando el volumen del tumor alcanzó 100-200 mm<sup>3</sup> (a las 3-4 semanas tras la inoculación). Los escaneos de PET y el análisis de imágenes se realizaron usando un escáner Inveon microPET (Siemens Medical Solutions). Se administraron aproximadamente 3,7 MBq (100 µCi/5µg) de <sup>64</sup>Cu-DOTA-Ab a través de inyección en la vena de la cola bajo anestesia con isoflurano. Se obtuvieron imágenes por PET estático de cinco 25 minutos en diferentes puntos temporales tras la inyección (p.i.; N = 4/grupo). Las imágenes se reconstruyeron usando un algoritmo de maximización de la expectativa del subconjunto ordenado bidimensional (2D OSEM) y no se aplicaron correcciones para la atenuación o la dispersión. Para cada escaneo, las regiones de interés (RDI) se dibujaron sobre el tumor y los órganos principales usando el programa informático del proveedor (ASI Pro 5.2.4.0) sobre imágenes coronales del cuerpo completo con la disminución corregida. Las concentraciones de radiactividad 30 (acumulación) en los tumores, músculo, hígado y riñones se obtuvieron a partir de valores medios de píxel con los múltiples volúmenes de las RDI y después se convirtieron a MBq por mililitro por minuto usando el factor de

- calibración determinado para el sistema de PET Inveon. Estos valores se dividieron después entre la actividad administrada para obtener (asumiendo una densidad tisular de 1 g/ml) un porcentaje de dosis inyectada por gramo (%DI/g) que proviene de las RDI de la imagen. Los resultados se muestran en la Figura 14.
- 35

Debido a su menor tamaño, <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3 presentó una acumulación en tumor tan pronto como a los 30 minutos tras la inyección. Tanto el hígado como los riñones presentaron una radiactividad muy alta, lo que indica la eliminación tanto hepatobiliar como renal-urinaria de este sdAb. En cambio, <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc presentó una acumulación en tumor mucho más lenta. A las 4 horas tras la inyección, los tumores se visualizaron claramente y la acumulación siguió aumentando con el tiempo. En cuanto al anticuerpo 9A6 de longitud completa, la absorción en el tumor fue mucho más lenta que para 2A3-mFc. El hígado y el corazón también presentaron alta radiactividad bien con 9A6 o 2A3-Fc como sonda de imagen. Los riñones no fueron visibles con estos dos Ab (Figura 15). Se usó IgG

de murino marcada como anticuerpo de control, con la BxPC3 mostrando una absorción mucho menor, lo que

45

40

La acumulación de los <sup>64</sup>Cu-DOTA-Ab sobre el tumor y los órganos principales se cuantificó basándose en imágenes de PET y se muestra en la Figura 16. Para 2A3, el tumor presentó la absorción más alta a 30 minutos tras la inyección con un % de Dl/g de (4,22 ± 1,13 % de Dl/g), que disminuyó de forma gradual a 3,85 ± 0,37 % de Dl/g a 2 horas tras la inyección. Los riñones presentaron una acumulación extremadamente alta, alcanzando el 102,7 ± 3,15

50 % de DI/g a 60 minutos. El hígado presentó un nivel de radiactividad similar a los tumores. La absorción en el tumor de <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc aumentó con el tiempo, específicamente el 11,8 ± 2,66, el 22,7 ± 5,90, el 43,1 ± 6,78 y el 98,2 ± 6,12 % de DI/g a las 2, 4, 8 y 24 horas tras la inyección, respectivamente. La absorción en el hígado disminuyó del 23,4 ± 2,68 % de DI/g a los 30 minutos hasta el 10,6 ± 1,14 % de DI/g a las 24 horas. El <sup>64</sup>Cu-DOTA-9A6 presentó un patrón similar al del 2A3-Fc, con menor absorción en tumor. Tras 24 h, la absorción en el tumor fue del 57,8 ± 3,73 y la absorción en el hígado fue del 11.6 ± 1,53. La absorción en tumor de <sup>64</sup>Cu-DOTA-lgG fue del 8,33 ± 1,66

3,73 y la absorción en el hígado fue del 11,6 ± 1,53. La absorción en tumor de <sup>64</sup>Cu-DOTA-IgG fue del 8,33 ± 1,66 %DI/g a las 24 horas, que fue significativamente menor que las de <sup>64</sup>Cu-DOTA-9A6 y <sup>64</sup>Cu-DOTA-2A3-Fc.

representa una perfusión no específica de la IgG hacia la región tumoral.

Las proporciones de tumor/no tumor de estos tres marcadores se enumeran en la Tabla 1. El 2A3 presentó una proporción tumor/sangre decente en un punto temporal muy temprano y aumentó con el tiempo, del 3,90 ± 1,47 a los 30 minutos hasta el 8,51 ± 1,12 a las 2 horas tras la inyección. La proporción tumor/músculo fue incluso más alta. Sin embargo, los tumores casi no tenían contraste con el hígado. En cuanto a 2A3-Fc, la proporción tumor/sangre fue muy mala en los puntos temporales tempranos hasta 8 horas tras la inyección del marcador. A las 24 horas tras la inyección, los tumores presentaron un excelente contraste con el fondo, con una proporción tumor/sangre del 9,25 ± 1,64, una proporción tumor/hígado del 9,29 ± 0,43 y una proporción tumor/músculo del 36,1 ± 13,9. La eliminación de 9A6 fue más lenta que la de 2A3-mFc, con una proporción tumor/sangre del 3,61 ± 0,28, una proporción

65 de 9A6 fue más lenta que la de 2A3-mFc, con una proporción tumor/sangre del 3,61 ± 0,28, una proporción tumor/hígado del 5,06 ± 1,04 y una proporción tumor/músculo del 29,9 ± 2,26 a las 24 horas tras la inyección.

		30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
2A3	T/S	3,90 ± 1,47	6,94 ± 2,01	8,51 ± 1,12			
	T/H	1,07 ± 0,20	1,25 ± 0,25	1,15 ± 0,16			
	T/R	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01			
	T/M	5,41 ± 1,15	9,13 ± 2,21	14,8 ± 6,46			
2A3-mFc	T/S	0,12 ± 0,04	0,23 ± 0,05	0,49 ± 0,07	1,07 ± 0,20	2,48 ± 0,15	9,25 ± 1,64
	T/H	0,15 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,57 ± 0,10	1,20 ± 0,22	2,53 ± 0,22	9,29 ± 0,43
	T/M	1,90 ± 0,51	2,65 ± 0,20	4,88 ± 0,86	13,9 ± 0,62	13,7 ± 3,69	36,1 ± 13,9
9A6	T/S	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,79 ± 0,08	3,61 ± 0,28
	T/H	0,20 ± 0,08	0,19 ± 0,01	0,32 ± 0,07	0,73 ± 0,05	1,33 ± 0,05	5,06 ± 1,04
	T/M	1,54 ± 0,63	1,28 ± 0,04	1,94 ± 0,56	5,03 ± 0,84	10,9 ± 3,10	29,9 ± 2,26

Tabla 1 Proporciones de tumor/no tumor de  $^{64}$ Cu-DOTA-Ab en ratones que llevan el tumor BxPC3 (n = 4/grupo)

Los resultados se presentan como la media ± DT (n=4). T, tumor; H, hígado; R, riñones; M, músculo.

### 5 Ejemplo 15: Biodistribución ex vivo

Inmediatamente después de la obtención de imágenes por PET (Ejemplo 14) los ratones que llevaban el tumor se sacrificaron y se diseccionaron. La sangre, el tumor, los órganos principales y los tejidos se extrajeron y se pesaron en húmedo. Se midió la radiactividad en el tejido completo húmedo con un contador y (Packard). Los resultados se expresaron como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g) para un grupo de 4 animales. Para cada ratón, se calibró la radiactividad de las muestras de tejido frente a una alícuota conocida del radiomarcador

- cada ratón, se calibró la radiactividad de las muestras de tejido frente a una alícuota conocida del radiomarcador inyectado y se normalizó a una masa corporal de 20 g. Los valores se expresaron como la media ± DT (n = 4/grupo).
- Tal como se muestra en la Figura 16, la absorción en el tumor BxPC3 de 2A3 fue del 5,65 ± 0,58 % de Dl/g a las 2
   horas tras la inyección. En consistencia con las imágenes por PET, 2A3-Fc presentó la absorción en tumor más alta a las 24 horas tras la inyección, que fue el 95,4 ± 29,3 % de Dl/g. La absorción en tumor de 9A6 e IgG fue del 66,8 ± 13,7 y del 11,2 ± 0,39 % de Dl/g respectivamente.
- Además, y para mostrar el grado de penetración de los anticuerpos en el tejido tumoral tras la inyección de los diferentes anticuerpos, los cortes de tumor congelados (espesor de 5 μm), preparados a partir de tumores mencionados anteriormente, se fijaron con acetona fría durante 10 minutos y se secaron al aire durante 30 minutos. Los cortes se enjuagaron con PBS durante 2 minutos y se bloquearon con suero de burro al 10 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones del tumor se tiñeron con IgG anti-ratón de burro conjugado con Cy3 (1:200), para ilustrar el anticuerpo anti-CEACAM6 que se unió a las células tumorales in vivo. Las secciones también
- 25 se cotiñeron con anticuerpos CD31 anti-ratón de rata durante 1 hora a temperatura ambiente y se visualizaron usando anticuerpo secundario anti-rata de burro conjugado con Dylight 488 (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) para ilustrar los límites de los vasos sanguíneos en el tumor. Se usó la tinción DAPI para mostrar los núcleos de las células. Se observaron los portaobjetos con un microscopio de epifluorescencia (Olympus, X81) (Figura 17).
- 30

35

40

10

Tal como se muestra en la Figura 17, para 9A6, la señal fluorescente se detectó principalmente dentro de varios diámetros celulares de los vasos sanguíneos. La señal fluorescente de 2A3-Fc se limitó a la región perivascular con una distancia difusiva más larga. La cotinción con CD31 demostró adicionalmente la localización perivascular limitada de 9A6 y 2A3-Fc en tumores BxPC3. Estos resultados indican que 2A3-Fc tiene una mejor penetración a través de los tejidos perivasculares que el anticuerpo 9A6 de longitud completa. Además, también se demostró que tanto 9A6 como 2A3-Fc mantienen su inmunorreactividad tras la conjugación con DOTA.

Las realizaciones y los ejemplos descritos en el presente documento son ilustrativos y no significa que limiten el alcance de la invención que se reivindica. Los inventores pretenden que las variaciones de las realizaciones anteriores, que incluyen alternativas, modificaciones y equivalentes, estén abarcadas por las reivindicaciones. Además, la combinación discutida de características podría no ser necesaria para la solución de la invención.

#### **Referencias**

45 Arbabi-Ghahroudi M., A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers, and S. Muyldermans, Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. FEBS Lett 414 (1997) 521-526.

Arbabi-Ghahroudi M, To R, Gaudette N, Hirama T, Ding W, MacKenzie R, Tanha J. Aggregation-resistant VHs selected by in vitro evolution tend to have disulfide-bonded loops and acidic isoelectric points. Protein Eng Des Sel 2009;22:59-66.

5 Armstrong T, Packham G, Murphy LB, et al. Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Clinical Cancer Research 2004;10:7427-37.

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, et al. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. Semin Oncol 1999;26:78-83.

Bell, A., Wang, Z.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Chang, T.A., Durocher, Y., Trojahn, U., Baardsnes, J., Jaramillo, M.L., Li, S., Baral, T.N., O'Connor-McCourt, M., Mackenzie, R. and Zhang, J. Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. Cancer Lett. 289, 81-90 (2010).

Birkedal-Hansen H, Yamada S, Windsor J, et al. Matrix metalloproteinases. Curr Protoc Cell Biol 2008;Chapter 10:Unit 10 8.

Blumenthal RD, Hansen HJ, Goldenberg DM. Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). Cancer Res 2005;65:8809-17.

Blumenthal RD, Leon E, Hansen HJ, Goldenberg DM. Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. BMC Cancer 2007;7:2.7.

- 25 Buchegger F, Schreyer M, Carrel S, Mach JP. Monoclonal antibodies identify a CEA crossreacting antigen of 95 kD (NCA-95) distinct in antigenicity and tissue distribution from the previously described NCA of 55 kD. Int J Cancer 1984;33:643-9.
- Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol. 1987;196(4):901-17.

Davies J., and L. Riechmann, Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding. Immunotechnology 2 (1996) 169-179.

35 De Kruif, J. and Logtenberg, T. Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semisynthetic antibody phage display library. J. Biol. Chem. 271, 7630-7634 (1996).

Doyle PJ, Arbabi-Ghahroudi M, Gaudette N, Furzer G, Savard ME, Gleddie S, McLean MD, Mackenzie CR, Hall JC. Cloning, expression, and characterization of a single-domain antibody fragment with affinity for 15-acetyl-deoxynivalenol. Mol Immunol 2008;45:3703-13.

Dumoulin m., K. Conrath, A. Van Meirhaeghe, F. Meersman, K. Heremans, L.G. Frenken, et al., Single-domain antibody fragments with high conformational stability. Protein Sci 11 (2002) 500-515.

45 Durocher, Y., S. Perret, et al. (2002). "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells." Nucleic Acids Res 30(2): E9.

Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Ashley SW, Whang EE. CEACAM6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. Br J Cancer 2004a;91:1384-90.

- Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Waseem T, Ashley SW, Whang EE. A novel role for carcinoembryonic antigenrelated cell adhesion molecule 6 as a determinant of gemcitabine chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma cells. Cancer Res 2004b;64:3987-93.
- 55 Duxbury MS, Ito H, Ashley SW, Whang EE. CEACAM6 cross-linking induces caveolin-1-dependent, Src-mediated focal adhesion kinase phosphorylation in BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells. J Biol Chem 2004c;279:23176-82.
- 50 Duxbury MS, Ito H, Ashley SW, Whang EE. c-Src-dependent cross-talk between CEACAM6 and alphavbeta3 50 integrin enhances pancreatic adenocarcinoma cell adhesion to extracellular matrix components. Biochem Biophys 51 Res Commun 2004d;317:133-41.

Duxbury MS, Matros E, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. Systemic siRNA-mediated gene silencing: a new approach to targeted therapy of cancer. Ann Surg 2004f;240:667-74; discussion 75-6.

65

10

15

20

40

Eisenberg, D.; E. Schwarz; M. Komaromy & R. Wall (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J Mol Biol, 179, 125-142

Els Conrath K, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. J Biol Chem 2001;276:7346-50.

5

10

20

35

55

60

Fedarovich A, Tomberg J, Nicholas RA, Davies C. Structure of the N-terminal domain of human CEACAM1: binding target of the opacity proteins during invasion of Neisseria meningitidis and N. gonorrhoeae. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006;62:971-9.

- Giannopoulos G, Pavlakis K, Parasi A, et al. The Expression of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 and their Tissue Inhibitor 2 in Pancreatic Ductal and Ampullary Carcinoma and their Relation to Angiogenesis and Clinicopathological Parameters. Anticancer Research 2008;28:1875-81.
- 15 Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N. and Hamers, R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363, 446-448 (1993).

Han F, Zhu H-G. Caveolin-1 Regulating the Invasion and Expression of Matrix Metalloproteinase (MMPs) in Pancreatic Carcinoma Cells. The Journal of surgical research 2010;159:443-50.

- Haq M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS. Addition of matrix metalloproteinase inhibition to conventional cytotoxic therapy reduces tumor implantation and prolongs survival in a murine model of human pancreatic cancer. Cancer Res 2000;60:3207-11.
- 25 Iqbal, U., Trojahn, U., Albaghdadi, H., Zhang, J., O'Connor, M., Stanimirovic, D., Tomanek, B., Sutherland, G. and Abulrob, A. (2010) Kinetic analysis of novel mono- and multivalent VHH-fragments and their application for molecular targeting of brain tumors. British Journal of Pharmacology (in press).
- Jespers, L., Schon, O., Famm, K. and Winter, G. Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. Nat. Biotechnol. 22, 1161-1165 (2004).

Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. J Immunol. 1991;147:1709-19.

- Kabat EA, Wu, T. T, Perry, H. M, Gottesman, K.S. and Koeler, C. Sequences of proteins of immunological interest. Publication 1991:91-3242.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. Cell 2010;141:52-67.Lefranc, M.-P. et al.,(2003) Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77.

Kunnumakkara AB, Sung B, Ravindran J, et al. {Gamma}-tocotrienol inhibits pancreatic tumors and sensitizes them to gemcitabine treatment by modulating the inflammatory microenvironment. Cancer Res 2010;70:8695-705.

- 45
   Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, G. "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains". Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)
- 50 Lewis-Wambi JS, Cunliffe HE, Kim HR, Willis AL, Jordan VC. Overexpression of CEACAM6 promotes migration and invasion of oestrogen-deprived breast cancer cells. Eur J Cancer 2008;44:1770-9.

Li S, Zheng W, Kuolee R, Hirama T, Henry M, Makvandi-Nejad S, Fjallman T, Chen W, Zhang J. Pentabodymediated antigen delivery induces antigen-specific mucosal immune response. Mol Immunol 2009;46:1718-26.

Merritt, E.A. and Hol, W.G. AB5 toxins. Current Opinion in Structural Biology 5, 165-171 (1995).

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.

- Nielsen, U.B., Adams, G.P., Weiner, L.M. and Marks, J.D. Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. Cancer Research 60, 6434-6440 (2000).
- Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Doughty, L., Pearson, K., Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., Hattarki, M., Carmichael,
   J.A., Irving, R.A. and Hudson, P.J. Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003).

Ordonez C, Screaton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. Cancer Res 2000;60:3419-24.

Ridgway JBB, Presta LG, Carter P. "Knobs-into-holes" engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Prot Eng 1996; 9:617-621

Schwarz RE, Konduri S, Awasthi N, Cafasso D, Schwarz MA. An antiendothelial combination therapy strategy to increase survival in experimental pancreatic cancer. Surgery 2009;146:241-9.

10 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2003;3:721-32.

Strickland LA, Ross J, Williams S, Ross S, Romero M, Spencer S, Erickson R, Sutcliffe J, Verbeke C, Polakis P, van Bruggen N, Koeppen H. Preclinical evaluation of carcinoembryonic cell adhesion molecule (CEACAM) 6 as potential therapy target for pancreatic adenocarcinoma. J Pathol 2009;218:380-90.

- 15 To, R., Hirama, T., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., Wang, P., Xu, P., Ni, F. and Tanha, J. Isolation of monomeric human VHs by a phage selection. J. Biol. Chem. 280, 41395-41403 (2005).
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF,
   Burchmore M, Shak S, Stewart SJ. First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. Oncology 2001;61 Suppl 2:37-42.

Wang Z, Kong D, Banerjee S, et al. Down-regulation of Platelet-Derived Growth Factor-D Inhibits Cell Growth and Angiogenesis through Inactivation of Notch-1 and Nuclear Factor-kapaB Signaling. Cancer Research 2007;67:11377-85.

Zhang, J., Li, Q., Nguyen, T.-D., Tremblay, T.-L., Stone, E., To, R., Kelly, J. and MacKenzie, C.R. A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents. J. Mol. Biol. 341, 161-169 (2004a).

- Zhang, J., Tanha, J., Hirama, T., Khieu, N.H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.-R. and MacKenzie, C.R. Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: A novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. J. Mol. Biol. 335, 49-56 (2004b).
- 35 Zhang J, MacKenzie R, Durocher Y. Production of chimeric heavy-chain antibodies. Methods Mol Biol 2009a;525:323-36, xv.

Zhang J, Liu X, Bell A, et al. Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. Protein Expr Purif 2009b;65:77-82.

US Patent No. 6180370

US Patent No. 5693761

45 US Patent No. 6054297

25

30

40

60

US Patent No. 5859205

- US Patent No. 5869619 50
- US Patent No. 5766886

US Patent No. 5821123

55 European Patent No. 519596

European Patent No. 626390

WO 95/04069

WO 2004/076670

WO 2003/046560

### REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo, que comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1 que comprende la secuencia GRTNSVYTMG (SEQ ID NO:1);

una CDR2 que comprende la secuencia IMWGAGTNTHYADSVKG (SEQ ID NO:2); y una CDR3 que comprende la secuencia AANRGIPIAGRQYDY (SEQ ID NO:3), en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es específico para CEACAM6.

10 2. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende la secuencia:

### QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCRTSGRTNSVYTMGWFRQAPGKEREFVAQIMWGAG

TNTHYADSVKGRFTISRDSAESTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAANRGIPIAGRQYDYWG QGTQVTVSS (SEQ ID NO:4), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma que conserva la actividad y especificidad de la SEQ ID NO:4.

3. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo se une a un epítopo que comprende la secuencia NRIGYSWYKG (SEQ ID NO:7).

4. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está multimerizado.

5. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo está enlazado a un fragmento Fc.

6. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de la reivindicación 5, en donde el fragmento Fc es Fc2b de ratón o Fc1 de humano.

30

5

15

20

7. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está enlazado a una molécula de carga seleccionada de moléculas terapéuticas o agentes de diagnóstico.

35 8. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está inmovilizado en una superficie.

9. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

40

10. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.

11. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en terapia o diagnóstico.

45

50

12. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 mediante la cual, el anticuerpo o fragmento

- a) está bloqueando la CEACAM6 y disminuyendo su invasión;
- b) está reduciendo la proliferación celular, la invasión y la actividad de MPM-9;
- c) está reduciendo la capacidad de las células tumorales para promover la angiogénesis o d) una combinación de los mismos.
- 13. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la molécula de
   carga se selecciona del grupo de agentes de diagnóstico que consisten en radioisótopo, un marcador paramagnético, un fluoróforo, un fluorocromo de infrarrojo cercano (NIR) o tinte, un marcador de afinidad, o una molécula detectable basada en proteína mediante fusión genética al anticuerpo, un tinte fluorescente o una enzima.
- 14. El anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento de acuerdo con la reivindicación 13, en
   donde el agente de diagnóstico se detecta mediante obtención no invasiva de imágenes ópticas, ultrasonido, IRM, PET o SPECT.
  - 15. Un método in vitro de diagnóstico de tumores, que comprende:
- 65 a) poner en contacto una muestra de tumor con el anticuerpo de un solo dominio aislado o purificado o un fragmento del mismo de la reivindicación 13; y

b) detectar la unión del anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo.

16. El método in vitro de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el agente de diagnóstico es un tinte fluorescente o una enzima y en donde la etapa de detección se lleva a cabo mediante tinción de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.







FIG. 1B

FIG. 1C

-----



FIG. 1D







FIG. 3



FIG. 4A





FIG. 5B

ES 2 664 989 T3



FIG. 5C



FIG. 5D







FIG. 6B



FIG. 6C

ES 2 664 989 T3





FIG. 7



FIG. 8A



FIG. 8B



FIG. 9







FIG. 11





FIG. 12



FITC-2A3-Fc









FIG. 14



FIG. 15



9A6

2A3-mFc

FIG. 17