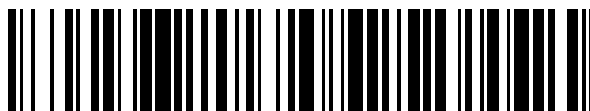


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 874**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010** E 15183297 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** EP 2990421

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

30 Prioridad:

30.04.2009 US 213040 P

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

22.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 668 874 T3

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

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

[0001] La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un anticuerpo anti-CEACAM1 aislado para su uso en el tratamiento de cáncer.

10 [0002] La proteína transmembrana CEACAM1 [también conocida como la glicoproteína biliar (BGP), CD66a y C-CAM1] es un miembro de la familia de antígeno carcinoembrionario (CEA), que también pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CEACAM1 interactúa con otras proteínas CD66 conocidas, incluidas las proteínas CD66a, CD66c y CD66e. Se expresa en un amplio espectro de células, que van desde células epiteliales a las de origen hematopoyético (p. ej., células inmunitarias).

15 [0003] Se han atribuido muchas funciones diferentes a la proteína CEACAM1. Se demostró que la proteína CEACAM1 exhibe propiedades antiproliferativas en carcinomas de colon, próstata y otros tipos de cáncer. Datos adicionales apoyan la participación central de CEACAM1 en angiogénesis y metástasis. CEACAM1 también juega un papel en la modulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Por ejemplo, se demostró que CEACAM1 es un receptor inhibitorio para células T activadas contenidas dentro del epitelio intestinal humano [véase WO99/52552 y Morales et al. J. Immunol. 163 (1999), 1363 - 1370]. Informes adicionales han indicado que el compromiso de CEACAM1 por reticulación de TCR con mAb o por las proteínas Opa de Neisseria gonorrhoeae inhibe la activación y proliferación de las células T.

25 [0004] El melanoma es una malignidad de células productoras de pigmento (melanocitos), responsable del 75% de la incidencia relacionada con el cáncer de piel en todo el mundo, principalmente debido a una metástasis extensa. El melanoma metastásico (MM) responde débilmente a la mayoría de los regímenes contra el cáncer y la media de supervivencia general para los pacientes con MM es de 8,5 meses. CEACAM1 rara vez se expresa mediante melanocitos normales, pero se encuentra con frecuencia en las células de melanoma. La expresión de CEACAM1 en lesiones de melanoma cutáneo primario predice fuertemente el desarrollo de enfermedad metastásica con mal pronóstico. Además, se observó una expresión aumentada de CEACAM1 en células NK derivadas de algunos pacientes con melanoma metastásico en comparación con donantes sanos.

35 [0005] El documento WO2007/063424 y la solicitud de patente estadounidense N° 20070110668 describen métodos para regular el sistema inmune, y en particular métodos para la regulación de una respuesta inmune específica, que incluyen la regulación de la actividad de los linfocitos. Estos métodos comprenden tanto la modulación negativa como la positiva de la función de la proteína CEACAM1.

40 [0006] La Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20070071758 describe métodos y composiciones para el tratamiento y diagnóstico de los cánceres. Específicamente, la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20070071758 enseña métodos y composiciones para potenciar la eficacia de la terapia con linfocitos infiltrantes de tumores (LIT) en el tratamiento del cáncer modulando negativamente la actividad de la proteína CEACAM1, tal como, por ejemplo, usando una inmunoglobulina específica para CEACAM1.

45 [0007] La Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20080108140 describe métodos de modulación de respuestas inmunitarias específicas para crear una inmunidad protectora en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades que requieren el trasplante de tejido. En particular, la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20080108140 se refiere a la supresión de las respuestas inmunes de una manera específica, mediante el aumento de la concentración funcional de la proteína CEACAM1 en el tejido diana.

50 [0008] La Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20040047858 da a conocer anticuerpos específicos (es decir, 34B1, 26H7 y 5F4) que son capaces de modular la actividad de las células T a través de CEACAM1 y usos de los mismos tales como en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la respuesta inmune (por ejemplo, enfermedad injerto contra huésped, enfermedades autoinmunes, cánceres, etc.).

55 [0009] La Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 20020028203, 20050169922 y 20080102071 describen composiciones que se unen moléculas receptoras inhibitorias de células T y modulan (es decir, potencian o suprimen) la actividad de células T (por ejemplo, la citotoxicidad y la proliferación), tales como agentes de unión de glicoproteína biliar, y métodos para usar tales composiciones tales como para el tratamiento de enfermedades (por ejemplo, una enfermedad autoinmune, inmunodeficiencia, cáncer, etc.).

60 [0010] La Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2007/110668 describe un anticuerpo selectivo CEACAM1 para entre otras cosas la orientación selectiva de las células cancerosas y para la regulación de las respuestas inmunes.

65 [0011] El documento WO 02/12535 describe el uso de anticuerpos anti-CEACAM para estimular células B en la producción de anticuerpos monoclonales o en inmunoterapia.

Otra técnica relacionada:

5 **[0012]** 5F4 mAb.: Regulación de la función citolítica de linfocitos intraepiteliales intestinales humanos por la glicoproteína biliar (CD66a) [Morales VM et al, J Immunol. (1999) 163 (3): 1363 - 70].

[0013] GM8G5 y 29H2- ambos disponibles comercialmente de Abcam Inc. abcamdotcomdotportal.

10 SUMARIO DE LA INVENCION

10 **[0014]** De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti CEACAM1 aislado o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno en combinación con los linfocitos para uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene las secuencias CDR y orientación del anticuerpo producido a partir de una célula de hibridoma que se ha depositado bajo el número de acceso ATCC PTA-9974.

15 **[0015]** Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de inmunomodulación, el método comprende poner en contacto un linfocito de expresión de CEACAM1 con un anticuerpo anti CEACAM1 aislado o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno, en el que la anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene las secuencias de CDR y la orientación del anticuerpo producido a partir de una célula de hibridoma que se ha depositado bajo el número de acceso ATCC PTA-9974.

20 **[0016]** De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo está unido a un resto citotóxico.

[0017] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el resto citotóxico comprende una citotoxina, una quimiocina, una quimioterapia, un pro-apoptótico, un interferón, un resto radiactivo, o combinaciones de los mismos.

25 **[0018]** De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los linfocitos comprenden células T o células NK.

[0019] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cáncer es melanoma.

30 **[0020]** Las realizaciones adicionales de la presente invención se especifican en las reivindicaciones adjuntas.

35 **[0021]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de las realizaciones de la invención, los métodos y/o materiales a modo de ejemplo se describen a continuación. En caso de conflicto, la especificación de la patente, incluidas las definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

40 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

45 **[0022]** Se describen en el presente documento algunas realizaciones de la invención, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para los fines de una discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

50 **[0023]** En los dibujos:

55 FIGS. 1A-B representan la especificidad del mAb MRG1. 721.221 células B parentales transfectadas establemente con CEACAM1 (verde), CEACAM5 (rojo), CEACAM6 (púrpura), CEACAM8 (azul) o simulacro (negro), se sometieron a análisis FACS usando los diferentes anticuerpos anti-CEACAM humanos: mAb MRG1 (FIG. 1A) y mAb Kat4c (FIG. 1B).

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

65 FIG. 3 representa la abolición de la función inhibidora de CEACAM1. El mAb MRG1 se preincubó con células diana (representadas en gris) o con células efectoras (representadas en blanco). Las células incubadas sin la adición del mAb se representan en negro. Las líneas de melanoma indicadas (526mel, 624mel o 09mel) se

usaron como células diana. Las células TIL014 se usaron como células efectoras en una relación E:T de 10:1. Después de una hora de incubación en hielo, las células recíprocas se añadieron y se co-incubaron durante 5 horas a 37°C. Las células diana se marcaron previamente con colorante fluorescente verde (CFSE) y se determinó la lisis específica mediante co-tinción con yoduro de propidio (PI) en citometría de flujo. La muerte espontánea fue restada. El ensayo se realizó por triplicado.

FIG. 4 representa el bloqueo de la invasión de melanoma por mAb MRG1. Las células de melanoma (08mel o 09mel) se preincubaron en ausencia o presencia de 1 µg/ml de mAb MRG1 y luego se analizaron mediante ensayos de invasión de Matrigel. La invasión se permitió durante 24 horas y la cantidad de células invasoras se cuantificó con XTT estandarizado.

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

FIGS. 6A-B representan la inhibición del crecimiento tumoral humano in vivo en ratones SCID mediante inyecciones sistémicas de MRG1 en comparación con PBS. Los experimentos se realizaron en dos configuraciones de la siguiente manera: Figura 6A: inyecciones simultáneas del anticuerpo (0,5 mg/ratón por vía intraperitoneal) e inoculación de células cancerosas (5.000.000 células por vía subcutánea); Figura 6B: tratamiento de tumores generados en ratones SCID (volumen del tumor de 75 mm³) por medio de inyecciones de anticuerpo MRG1 (como se indica más arriba).

FIG. 7 muestra una eficacia mejorada en la inhibición del crecimiento tumoral mediante una combinación de MRG1 con administración intravenosa de LIT reactiva humana en comparación con LIT intravenosa solamente.

FIG. 8 representa el efecto superior del mAb MRG1 sobre los anticuerpos monoclonales anti-CEACAM1 descritos previamente, así como el anticuerpo policlonal de conejo disponible comercialmente que se dirige al CEACAM1 humano (DAKO, Glostrup Dinamarca), según se determina por ensayo de bloqueo funcional. Varios anticuerpos anti-CEACAM1 se ensayaron para el bloqueo de la actividad de CEACAM1, según lo informado por la secreción de mL-2. 100% se definió como actividad en ausencia de cualquier anticuerpo. Se presentan los resultados de un experimento representativo de tres, cada uno realizado por triplicado.

DESCRIPCIÓN DE FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

[0024] La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un anticuerpo anti CEACAM1 aislado o fragmento de anticuerpo para su uso en el tratamiento de cáncer.

[0025] Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, es de entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras.

[0026] El presente inventor ha producido a través de experimentación laboriosa y cribado un anticuerpo monoclonal selectivo para CEACAM1. Este anticuerpo demostró ser superior a otros anticuerpos monoclonales anti CEACAM1 como se demostró mediante ensayos de bloqueo funcional.

[0027] Como se ilustra en el presente documento a continuación, el anticuerpo MRG1 producido de acuerdo con las presentes enseñanzas, es selectivo a CEACAM1 y no tiene reacciones cruzadas con otros miembros de la familia CEACAM (es decir, CEACAM 5, 6 y 8, véase Ejemplo 2). El anticuerpo inhibe las interacciones homófilas de CEACAM1, según se determina mediante co-incubación de células efectoras inmunes y células de melanoma diana y ensayando la secreción de IL-2 y la lisis celular (véase el Ejemplo 3). Además, el anticuerpo se mostró eficaz en la inhibición de la invasión y proliferación de células de melanoma. Finalmente, la administración *in vivo* del anticuerpo solo o en combinación con linfocitos reactivos se mostró eficaz para inhibir el crecimiento de tumores de melanoma. En conjunto, las presentes enseñanzas sugieren que el anticuerpo, fragmentos y derivados de MRG1 se pueden usar como una herramienta efectiva para la inmunomodulación y el tratamiento del cáncer.

[0028] Por lo tanto, se proporciona una célula de hibridoma que ha sido depositada bajo el Número de Acceso ATCC PTA-9974.

[0029] También se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que tiene los segmentos de CDR y la orientación del anticuerpo producido a partir de la célula de hibridoma, descritos anteriormente.

[0030] El anticuerpo de las presentes enseñanzas es capaz de CEACAM1 de unión con una afinidad mínima de 10⁻⁶ 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ M.

[0031] Tal como se utiliza aquí, el término "CEACAM1" se refiere al producto de proteína del gen por ejemplo CEACAM1, NP_001020083.1, NP_001703.2.

[0032] El término "anticuerpo" como se usa en esta invención incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv que son capaces de unirse a los macrófagos. De acuerdo

con una realización ejemplar, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal tal como se denomina en la presente memoria, MRG1. Los fragmentos funcionales de anticuerpos se definen de la siguiente manera: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; dos fragmentos Fab' se obtienen por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unida por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

[0033] Como se indicó anteriormente, el anticuerpo utilizado en el contexto de la presente invención tiene las mismas regiones determinantes de complementariedad de orientación (CDR) que el del anticuerpo producido por células de hibridoma, que tiene los datos de depósito como se describió anteriormente. Es decir, CDR1, CDR2, CDR3 se colocan con la misma orientación en las cadenas V_H y V_L.

[0034] Los fragmentos de anticuerpo según la presente invención se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes de 3,5S Fab'. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos están descritos, por ejemplo, por Goldenberg, patente de EE.UU. N^{os} 4.036.945 y 4.331.647, y referencias contenidas en el mismo. Véase también Porter, RR [Biochem. J. 73: 119 - 126 (1959)]. También se pueden usar otros métodos para dividir anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena liviana-pesada, una escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

[0035] Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al. [Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 69: 2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por productos químicos tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un enlazador peptídico. Las proteínas de unión a antígeno monocatenarias (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir sFvs se describen, por ejemplo, por [Whitlow y Filpula, Methods 2: 97-105 (1991)]; Bird et al, Science 242:423-426 (1988); Pack et al., Bio/Technology 11: 1271-1277 (1993); y la Patente de EE.UU. N^o 4.946.778.

[0036] Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región de determinación de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de las células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)]. Las CDR se pueden implementar en cualquier forma de un anticuerpo tal como mediante el uso de tecnología de ADN recombinante.

[0037] Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab'), sub.2 u otro antígeno - subsecuencias de unión de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad deseada, afinidad y capacidad. En algunos casos, los residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de

inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321: 522- 525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323 - 329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593 - 596 (1992)].

[0038] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos de importación, que normalmente se toman de un dominio variable de importación. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., Nature, 321: 522- 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 - 327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de EE.UU. N° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[0039] Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147 (1): 86 -95 (1991)]. De forma similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la prueba, se observa producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se ve en humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°s 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10,: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845 - 51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65 - 93 (1995).

[0040] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo está unido a un resto citotóxico.

[0041] Alternativamente, el anticuerpo se puede unir a un resto identificable.

[0042] El resto identificable puede ser un miembro de un par vinculante, que es identificable a través de su interacción con un miembro adicional del par de enlace y una etiqueta que se visualiza directamente. En un ejemplo, el miembro del par de unión es un antígeno que se identifica por un anticuerpo marcado correspondiente. En un ejemplo, la etiqueta es una proteína fluorescente o una enzima que produce una reacción colorimétrica.

[0043] La siguiente Tabla 1 proporciona ejemplos de secuencias de restos identificables.

Tabla 1

Grupo identificable	Secuencia de aminoácidos (número de acceso de Genebank)	Secuencia de ácido nucleico (número de acceso de Genebank)
Proteína fluorescente verde	AAL33912	AF435427
Fosfatasa alcalina	AAK73766	AY042185
Peroxidasa	NP_568674	NM_124071
Etiqueta de histidina	AAK09208	AF329457
Etiqueta Myc	AF329457	AF329457
Etiqueta Biotina ligasa	NP_561589	NC_003366
proteína fluorescente naranja	AAL33917	AF435432
Beta galactosidasa	NM_125776	NM_125776
Isotiocianato de fluoresceína	AAF22695	AF098239
Estreptavidina	S11540	S11540

[0044] El resto citotóxico o terapéutico puede ser, por ejemplo, un resto citotóxico, un resto tóxico, un resto de citoquina, un resto de anticuerpo biespecifico, una citotoxina, una quimioterapia, una quimioterapia, un pro-apoptótico, interferón, un resto radiactivo, o combinaciones de los mismos, ejemplos de los cuales se proporcionan a continuación.

[0045] La siguiente Tabla 2 proporciona ejemplos de secuencias de restos terapéuticos.

Tabla 2

Resto terapéutico	Secuencia de aminoácidos (número de acceso de GenBank)	Secuencia de ácido nucleico (número de acceso GenBank)
Exotoxina de Pseudomonas	ABU63124	EU090068
Toxina diftérica	AAV70486	AY820132.1
interleuquina 2	CAA00227	A02159
CD3	P07766	X03884
CD16	NP_000560.5	NM_000569.6
interleuquina 4	NP_000580.1	NM_000589.2
HLA-A2	P01892	K02883
interleuquina 10	P22301	M57627
Toxina de ricina	EEF27734	EQ975183

[0046] Se apreciará que tales fusiones se puede efectuar usando conjugación química o mediante tecnología de ADN recombinante.

[0047] El anticuerpo, como se usa en el contexto de la presente invención puede disminuir las interacciones CEACAM1 inhibitorias homofílicas (o homotípicas) o heterotípicas para aumentar de este modo la actividad de los linfocitos. Las interacciones homófilas de CEACAM1 ocurren a través del dominio N. Varios aminoácidos son cruciales para esta interacción, incluidos R43, Q44, D64 y R82. La interacción provoca la fosforilación de un residuo de tirosina citoplasmática que recluta fosfatasa SHP-1. Esto inicia una cascada inhibitoria dentro de los linfocitos, que se dirige a los mediadores proximales, como ZAP70.

[0048] Por lo tanto, el anticuerpo, como se usa en el contexto de la presente invención se puede utilizar para bloquear CEACAM1 en cualquiera o ambas células efectoras inmunes (linfocitos que expresan CEACAM1 por ejemplo, células infiltrantes de tumores, las células T o células NK) y células diana (por ejemplo, CEACAM1 que expresa células patológicas tales como células cancerosas). Los ejemplos de células cancerosas que son candidatas para esta terapia incluyen, entre otras, melanoma, pulmón, tiroides, mama, colon, próstata, hígado, vejiga, renal, cervical, pancreático, leucemia, linfoma, mieloides, ovario, útero, sarcoma, células biliares o endometriales.

[0049] También se describen anticuerpos aislados o fragmentos de anticuerpos que compiten por la unión a CEACAM1 con los anticuerpos producidos por la célula de hibridoma descrita anteriormente. Esos anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados, xenogénicos o quiméricos (como se describe en detalle anteriormente) que son adecuados para, por ejemplo, aplicaciones terapéuticas. Un fragmento de anticuerpo del anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fv monocatenario, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂.

[0050] Por lo tanto, se describe también un método para hacer una célula tumoral que expresa CEACAM1 susceptibles a inmunomodulación. El método que comprende poner en contacto la célula tumoral que expresa CEACAM1 (p. ej., melanoma, pulmón, tiroides, mama, colon, próstata, hígado, vejiga, riñón, cuello uterino, páncreas, leucemia, linfoma, mieloides, ovario, útero, sarcoma, células biliares o endometriales) con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito anteriormente, lo que hace que la célula tumoral que expresa CEACAM1 sea susceptible de inmunomodulación.

[0051] Como se usa en el presente documento "la inmunomodulación" se refiere a la inmunomodulación dependiente de linfocitos (por ejemplo, por las células NK o linfocitos infiltrantes de tumor).

[0052] Adicionalmente o alternativamente, la presente invención también prevé un método de inmunomodulación (por ejemplo, la inhibición de interacción CEACAM1 proteína-proteína homotípica o heterotípica), poniendo en contacto un linfocito de expresión CEACAM1 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento.

[0053] Los métodos de las presentes enseñanzas pueden realizarse in vitro, ex vivo (por ejemplo, usados en inmunoterapia adoptiva en base a células T) o in vivo.

[0054] Como se ha mencionado, los anticuerpos como se describen aquí pueden tener actividad anti cáncer que es independiente de su actividad inmunomoduladora descrita anteriormente.

[0055] Por lo tanto, las presentes enseñanzas proporcionan además un método de inhibición de la migración o

proliferación de una célula tumoral que expresa CEACAM1, el método comprende poner en contacto la célula tumoral que expresa CEACAM1 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento, inhibiendo de este modo la migración o proliferación de una CEACAM1 que expresa la célula tumoral.

5 **[0056]** Como se utiliza aquí, "inhibir" se refiere a al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 100% de inhibición en la proliferación o migración que puede ser ensayada mediante métodos que son bien conocidos en la técnica (véase la sección de ejemplos a continuación).

10 **[0057]** Los anticuerpos como se usan en el contexto de la presente invención se pueden usar eficazmente para el tratamiento del cáncer.

15 **[0058]** De acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en la presente memoria, tratando de este modo el cáncer en el sujeto. Los ejemplos de cáncer que pueden diagnosticarse o tratarse según las presentes enseñanzas incluyen, entre otros, melanoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de cuello uterino, cáncer de páncreas, leucemia, linfoma, cáncer relacionado con células mieloides, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer biliar o cáncer de endometrio.

20 **[0059]** De acuerdo con una realización específica de la presente invención, el cáncer es melanoma.

25 **[0060]** El término "tratar" se refiere a inhibir, prevenir o detener el desarrollo de una patología (enfermedad, trastorno o condición) y/o causar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la técnica comprenderán que se pueden usar diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una patología, y de forma similar, se pueden usar diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, la remisión o la regresión de una patología.

30 **[0061]** Tal como se utiliza aquí, el término "prevenir" se refiere a mantener una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto que puede estar en riesgo de la enfermedad, pero que aún no ha sido diagnosticado por tener la enfermedad.

35 **[0062]** Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" incluye mamíferos, seres humanos preferiblemente a cualquier edad que sufran de la patología. Preferiblemente, este término abarca individuos que están en riesgo de desarrollar la patología.

40 **[0063]** Con el fin de mejorar el tratamiento (por ejemplo, el tratamiento del cáncer), los linfocitos tales como células T (por ejemplo linfocitos infiltrantes de tumor) o células NK se pueden administrar al sujeto antes de, de forma concomitante con o después de la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se usa en el contexto de la presente invención. En consecuencia, los linfocitos pueden obtenerse del sujeto (por ejemplo, de la sangre periférica o del tumor de la misma) o de un donante (un donante alogénico o un linfocito singénico), tratados mediante métodos de expansión ex vivo en cuanto a linfocitos viables obtenidos [por ejemplo por crecimiento en la capa alimentadora irradiada suplementada con IL-2, como se describió previamente en Besser MJ y col., Clin Cancer Res (Epub antes de la publicación) el 1 de mayo de 2010 y en Besser MJ y col., Journal of Immunotherapy (Epub antes de la publicación) 2009 1 de abril] y administrado al sujeto.

45 **[0064]** Se apreciará que el sujeto puede ser tratado por cualquier otro tratamiento anti-cáncer (por ejemplo quimioterapia, radioterapia, etc.) antes de la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o antes de la administración de los linfocitos.

50 **[0065]** El anticuerpo, como se usa en el contexto de la presente invención se puede administrar a un organismo de por sí, o en una composición farmacéutica donde se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.

55 **[0066]** Como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica consiste en facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

60 **[0067]** Aquí el término "ingrediente activo" se refiere al anticuerpo responsable del efecto biológico.

65 **[0068]** De aquí en adelante, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse de manera intercambiable se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante está incluido en estas frases.

[0069] Aquí el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para

facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

5 **[0070]** Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

10 **[0071]** Las vías adecuadas de administración pueden, por ejemplo, incluir administración oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, entrega intestinal o parenteral, incluyendo intramuscular, subcutánea e inyecciones intramedulares, así como intratecal, intraventricular directa, intracardiaca, por ejemplo, en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, inyecciones intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

15 **[0072]** Los enfoques convencionales para la administración de fármacos al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de superficie de la célula endotelial en combinación con un agente que es incapaz de cruzar la BHE) en un intento de explotar una de las rutas de transporte endógeno de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (p. ej., conjugación de agentes solubles en agua con portadores de lípidos o colesterol); y la interrupción transitoria de la integridad de la BHE por disrupción hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina). Sin embargo, cada una de estas estrategias tiene limitaciones, como los riesgos inherentes asociados con un procedimiento quirúrgico invasivo, una limitación de tamaño impuesta por una limitación inherente a los sistemas de transporte endógeno, efectos secundarios biológicos potencialmente indeseables asociados con la administración sistémica de una molécula quimérica compuesta de un motivo portador que podría estar activo fuera del SNC, y el posible riesgo de daño cerebral dentro de las regiones del cerebro donde se interrumpe el BBB, lo que lo convierte en un método de entrega subóptimo.

20

25

30 **[0073]** Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica en forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido de un paciente.

35 **[0074]** El término "tejido" se refiere a parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tienen una estructura similar y/o una función común. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tejido cerebral, retina, tejido cutáneo, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, cartílago, tejido conectivo, tejido sanguíneo, tejido muscular, tejido cerebral del tejido cardíaco, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal, tejido hematopoyético.

40 **[0075]** Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

45 **[0076]** Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que, pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida.

50 **[0077]** Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se puede formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosal, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a penetrar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

55 **[0078]** Para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden agregarse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

60

65 **[0079]** Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de

disolventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

5 **[0080]** Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar
10 estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la ruta de administración elegida.

15 **[0081]** Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

20 **[0082]** Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para su uso según la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un dispensador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

25 **[0083]** La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con opcionalmente un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.
30

35 **[0084]** Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones de inyección apropiadas a base de aceite o agua. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

40 **[0085]** Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, solución por ejemplo, a base de agua estéril, libre de pirógenos, antes del uso.

45 **[0086]** La composición farmacéutica puede formularse también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

50 **[0087]** Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de ingredientes activos efectivos para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, cáncer) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

55 **[0088]** La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en este documento.

60 **[0089]** Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos in vitro y de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr una concentración o título deseados. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

65 **[0090]** La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en este documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar in vitro, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos in vitro y de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista de la condición del paciente.

(Véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

[0091] La cantidad de dosis y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles de anticuerpo del ingrediente activo que sean suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración efectiva mínima, MEC). El MEC variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos in vitro. Las dosis necesarias para lograr el MEC dependerán de las características individuales y la vía de administración. Los ensayos de detección se pueden usar para determinar las concentraciones en plasma.

[0092] La eficacia terapéutica puede validarse adicionalmente en modelos animales correlativos que son bien conocidos en la técnica. Xenoinjertos humanos en ratones inmunodeficientes. Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola o una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se produce la curación o se logra la disminución del estado de la enfermedad.

[0093] La cantidad de una composición para ser administrada estará, por supuesto, dependiente del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

[0094] Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, comprender metal o papel de aluminio, como un blister. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. El paquete o dispensador también puede acomodarse mediante un aviso asociado con el contenedor en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, notificación que refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o administración veterinaria. Tal notificación, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. para medicamentos con receta o de un producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación formulada en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se detalla más detalladamente anteriormente.

[0095] Aparte de aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos tal como se utiliza en el contexto de la presente invención también se pueden utilizar en aplicaciones de diagnóstico.

[0096] Por lo tanto, se describe también un método para diagnosticar un cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, el método comprende poner en contacto una muestra biológica derivada del sujeto (in vivo o ex vivo) con el fragmento de anticuerpo o anticuerpo descrito en el presente documento, en el que una formación de complejo más allá de un umbral predeterminado es indicativa del cáncer en el sujeto. Las células del cáncer se pueden caracterizar por sobreexpresión de CEACAM1 en comparación con células no afectadas.

[0097] Como se ha mencionado, el método de la invención se efectúa bajo condiciones suficientes para formar un inmunocomplejo; tales condiciones (por ejemplo, concentraciones apropiadas, tampones, temperaturas, tiempos de reacción) así como métodos para optimizar tales condiciones son conocidas por los expertos en la técnica, y se describen aquí ejemplos. Como se usa en este documento, la frase "inmunocomplejo" se refiere a un complejo que comprende el anticuerpo como se usa en el contexto de la invención y el CEACAM1.

[0098] La determinación de una presencia o nivel del inmunocomplejo puede ser directa o mediante la detección de un resto identificable (detectable) que puede unirse al anticuerpo.

[0099] El nivel del inmunocomplejo en la célula ensayada (por ejemplo, una célula de un sujeto en necesidad) se compara con un umbral predeterminado. Se apreciará que el anticuerpo como se usa en el contexto de la presente invención también puede usarse para medir la cantidad de CEACAM1 soluble en suero. Independientemente, el umbral se puede determinar basándose en un nivel de referencia conocido y/o un nivel en una célula o suero de control. La célula de control se puede obtener a partir de un sujeto saludable de control (por ejemplo, un sujeto que no padece el cáncer) o del mismo sujeto antes del inicio de la enfermedad o después del tratamiento. El sujeto de control puede ser de la misma especie, por ejemplo, humano, preferiblemente emparejado con la misma edad, peso, sexo, etc. que el sujeto que lo necesite.

[0100] Tal como se utiliza aquí, el término "diagnosticar" se refiere a la determinación de la presencia o ausencia de una patología, la clasificación de una patología o un síntoma, la determinación de una severidad de la patología, el seguimiento de progresión de la patología, la previsión de un resultado de una patología y/o perspectivas de recuperación.

[0101] Para facilitar el diagnóstico, las enseñanzas anteriores se pueden combinar con otros métodos de diagnóstico de cáncer que son bien conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, formación de imágenes, pruebas moleculares y biopsias quirúrgicas.

[0102] Una vez que se establece el diagnóstico, el sujeto es informado del diagnóstico y pueden iniciarse los

tratamientos adecuados.

[0103] Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "incluyendo pero no limitado a". Este término abarca los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

[0104] La frase "consiste esencialmente en" significa que la composición o el método pueden incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero sólo si los ingredientes y/o etapas no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición o método reivindicado adicionales.

[0105] Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una", "el" y "ella" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, que incluyen mezclas de los mismos.

[0106] A lo largo de esta solicitud, varias realizaciones de esta invención se pueden presentar en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los posibles subintervalos así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un rango como del 1 al 6 tiene subrangos revelados específicamente, como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como a los números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

[0107] Siempre que se indique aquí un rango numérico, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del rango indicado. Las frases "que varían/se extienden entre" un primer número de indicación y un segundo indican un número y "rango/rangos de" un primer número de indicación "a" un segundo número de indicación se usan indistintamente y pretenden incluir el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios e integrales entre ellos.

[0108] Tal como se utiliza aquí, el término "método" se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada incluyendo, pero no limitado a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos por, o fácilmente desarrollados a partir de maneras conocidas, medios, técnicas y procedimientos por parte de profesionales de las artes química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

[0109] La palabra "ejemplar" se usa en este documento para significar "que sirve como un ejemplo, o ilustración". Cualquier realización descrita como "ejemplar" no debe interpretarse necesariamente como preferida o ventajosa sobre otras realizaciones y/o excluir la incorporación de características de otras realizaciones.

[0110] La palabra "opcionalmente" se usa en el presente documento para indicar "se proporciona en algunas realizaciones y no se proporciona en otras realizaciones". Cualquier realización particular de la invención puede incluir una pluralidad de características "opcionales" a menos que tales características entren en conflicto.

[0111] Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como es adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

[0112] Diversas formas de realización y aspectos de la presente invención tal como se delinearon anteriormente y según se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

[0113] Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitativa.

[0114] En general, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN recombinante moleculares, bioquímicas, microbiológicas y tales técnicas se explican minuciosamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual", Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en la Patente de EE.UU. N^{os} 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 and 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N^{os} 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual", CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

EJEMPLO 1

Generación de anticuerpos monoclonales

Generación de anticuerpos monoclonales MRG1

[0115] Se generó un anticuerpo monoclonal que bloquea eficazmente las interacciones homófilas de CEACAM1 in vitro a concentraciones nanomolares. Brevemente, los ratones se inmunizaron 3 veces, a intervalos de 2 semanas, con 5 microgramos de CEACAM1 humano recombinante (proteína completa, comercialmente disponible de R&D Systems). Los esplenocitos se recogieron y fusionaron con células SP2/0, para generar una biblioteca de hibridoma.

[0116] El hibridoma que produce el anticuerpo de bloqueo de CEACAM1 (mAb MRG1) fue re-clonado varias veces para producir un clon estable.

Otros anticuerpos monoclonales

[0117] Se adquirieron mAb Kat4c y anti-CEACAM policlonal de conejo de DAKO (Glostrup, Dinamarca).

EJEMPLO 2

Especificidad de mAb anti CEACAM1

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Generación de células que expresan CEACAM

[0118] Células humanas 721.221 CEACAM-negativas (células B parentales) fueron transfectadas de forma estable con CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 o CEACAM8 por electroporación y selección con G418.

[0119] Las células parentales BW murinas de timoma (células que carecen de cadenas alfa y beta de TCR, sin embargo, retienen maquinaria de secreción completa de IL-2) fueron transfectadas con una molécula quimérica que comprende la porción extracelular de CEACAM1 humano fusionado a la transmembrana y la cola citosólica de cadena zeta murina. La transfección se realizó mediante electroporación y selección con G418.

Detección de anticuerpos por FACS

[0120] Los hibridomas se cribaron para la actividad de unión a CEACAM1 por citometría de flujo de la siguiente manera:

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

RESULTADOS

[0121] Ya que 721.221 células parentales no expresan ninguna de las proteínas CEACAM, estas células fueron transfectadas de forma estable con CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 o CEACAM8 con el fin de ensayar la especificidad de los anticuerpos monoclonales (mAbs) CEACAM1. Los hibridomas se cribaron a continuación para la actividad de unión a CEACAM1 mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 1A, el mAb MRG1 generado de acuerdo con las presentes enseñanzas es específico para CEACAM1 humano. Tiene una reactividad cruzada insignificante con CEACAM5 y sin unión a CEACAM6 o CEACAM8. La Figura 1B muestra que todos los transfectantes expresaron moléculas de CEACAM, siendo CEACAM1 el más bajo, lo que enfatiza el patrón de especificidad de MRG1.

EJEMPLO 3

El mAb es capaz de inhibir la unión homofílica de CEACAM1.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**Detección de anticuerpos mediante ELISA.**

[0122] La actividad de bloqueo CEACAM1 se ensayó usando un sistema funcional BW. El sistema funcional BW comprende una línea celular de ratón (BW) transfectada de forma estable con una molécula quimérica que comprende el dominio extracelular de CEACAM1 humano fusionado a la cadena zeta de ratón (BW/CEACAM1-zeta, véase el Ejemplo 2, anterior). La co-incubación de las células BW/CEACAM1-zeta con otras células positivas para CEACAM1 dio como resultado la secreción de concentraciones medibles de IL-2 de ratón.

[0123] Así, BW/CEACAM1-zeta (células efectoras) o 221/CEACAM1 (células diana) se preincubaron cada una por separado con 10-40 ng/ml de mAb MRG1. Después de una hora de incubación en hielo, se añadieron las células recíprocas (221/CEACAM1 o BW/CEACAM1) y se midió la secreción de IL-2 de ratón mediante ELISA tipo sándwich (R&D Systems).

Ensayo de citotoxicidad

[0124] Los ensayos de citotoxicidad que prueban la muerte de diversas líneas de melanoma por los linfocitos infiltrantes de tumores se realizaron en presencia o ausencia de 1 µg/ml mAb MRG1. Las células de melanoma CEACAM1^{Alto} 526mel, 624mel y CEACAM1^{dim} 09mel se usaron como células diana. Las células TIL014 se usaron como células efectoras en una relación E:T de 10:1. Después de una hora de incubación con el mAb MRG1 en hielo, las células recíprocas se añadieron y se co-incubaron durante 5 horas a 37°C. Las células diana se marcaron previamente con un colorante fluorescente verde (CFSE) y se determinó la lisis específica mediante co-tinción de yoduro de propidio (PI) en citometría de flujo. La muerte espontánea fue restada.

RESULTADOS

[0125] Se verificó la capacidad del mAb MRG1 purificado para inhibir la unión homofílica de CEACAM1. Como se muestra en la Figura 2, el mAb MRG1 purificado mostró una inhibición dependiente de la dosis de la unión homofílica de CEACAM1. A una concentración de 10 ng/ml, el mAb redujo eficazmente las interacciones de CEACAM1, llegando efectivamente a un nivel a una concentración de 20 ng/ml. Es importante destacar que los dos ajustes experimentales, es decir, la adición de mAb MRG1 a las células efectoras, BW/CEACAM1-zeta, o a las células diana, 221/CEACAM1, mostraron resultados similares (la secreción de IL-2 del ratón se bloqueó eficazmente).

[0126] El efecto de bloqueo de mAb MRG1 se demostró adicionalmente en ensayos de citotoxicidad. Como se muestra en la Figura 3, la eliminación de las células CEACAM1^{Alto} 526mel y 624mel se mejoró mediante la incubación del anticuerpo con células efectoras (pero no en células diana). La muerte de las células CEACAM1^{dim} 09mel no se vio afectada por la presencia de mAb MRG1 (FIG. 3).

EJEMPLO 4

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

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**Ensayo de invasión**

[0127] El efecto de bloqueo de los anticuerpos se ensayó en un ensayo de invasión. Brevemente, las células de melanoma (08mel o 09mel) se preincubaron en presencia o ausencia de 1 µg/ml de mAb MRG1 y luego se analizaron mediante ensayos de invasión de Matrigel. La invasión se permitió durante 24 horas y la cantidad de

células invasoras se cuantificó con XTT estandarizado.

Ensayo de proliferación neta

5 [0128] Las células CEACAM1^{alto} 526mel fueron sembradas el día 0 en placas de 48 pocillos (2.500 células por pocillo). En la siembra, MRG1 se añadió en 3 concentraciones diferentes (0,5, 1 o 3 µg/ml), o no se agregó en absoluto. Las células viables totales se contaron 2 días o 5 días después de la siembra. La proliferación se determinó con XTT estandarizado y mediante conteo directo de células.

10 **RESULTADOS**

[0129] Como se muestra en la Figura 4, MRG1 bloqueó la invasión de las células 08mel CEACAM1-positivas (nivel de expresión CEACAM1 era intensidad de fluorescencia media, es decir, mediana de expresión de CEACAM1 era 50) y tenía poco o ningún efecto sobre las células CEACAM1^{dim} 09mel (el nivel de expresión de CEACAM1 fue bajo, es decir, la intensidad de fluorescencia media de la expresión de CEACAM1 fue 15).

15 [0130] MRG1 también se probó en ensayos de proliferación neta. Se observó una inhibición dependiente de la dosis en la proliferación neta de células 526mel (FIG. 5). Después de 5 días de tratamiento, la proliferación se reduce en más de 60% (con 3 µg mAb MRG1).

20 **EJEMPLO 5**

MRG1 inhibe el crecimiento de células cancerígenas en modelos experimentales animales

25 **MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

Modelos de xenoinjerto de melanoma

30 [0131] Se inyectaron 5 x 10⁶ células de melanoma humano CEACAM1⁺ por vía subcutánea en ratones SCID-NOD de 7 semanas de edad. Las masas tumorales se formaron en el 100% de los ratones en 14-17 días y continuaron creciendo. Las dimensiones tumorales se controlaron de forma no invasiva con un calibre 3 veces por semana y la aproximación del volumen se calculó como (d1 x d2 x d3/2).

35 [0132] La administración de MRG1 se realizó por inyección de 0,5 mg de anticuerpo diluido en 0,5 ml de PBS estéril por vía intraperitoneal. La inyección de PBS sirvió como control.

[0133] La administración de linfocitos humanos anti-melanoma reactivos se realizó por inyección intravenosa en la vena de la cola de 20 x 10⁶ células diluidas en 200 µl de PBS estéril.

40 **RESULTADOS**

[0134] En línea con las funciones de bloqueo demostradas anteriormente, la administración del anticuerpo MRG1 inhibió el crecimiento tumoral. Este efecto fue evidente cuando el anticuerpo se administró en el momento de la inoculación de células tumorales (FIG. 6A, "Configuración de prevención") o después de que ya se había formado una masa tumoral medible (FIG. 6B, "Configuración del tratamiento"). Estos efectos fueron evidentes después de 4 inyecciones en 8 días, seguidas de una monitorización no invasiva (véase flechas en la Figura 6). Debe observarse que este efecto fue independiente de cualquier efecto inmunomodulador, ya que los ratones SCID-NOD son inmunodeficientes.

50 [0135] La simulación de la respuesta inmune anti-melanoma se realizó mediante una única inyección intravenosa de linfocitos humanos anti-melanoma reactivos, que inhibieron el crecimiento tumoral (FIG. 7). Este efecto se mejoró significativamente mediante inyecciones intraperitoneales de MRG1 una vez a la semana.

55 **EJEMPLO 6**

MRG1 es superior a los anticuerpos anti-CEACAM1 descritos anteriormente.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

60 ***Detección de anticuerpos mediante ELISA.***

[0136] La actividad de bloqueo CEACAM1 se ensayó usando un sistema funcional BW como se describe en detalle en el Ejemplo 3, anteriormente.

65 [0137] Se preincubaron 100.000 células BW/CEACAM1-zeta con 15 ng/ml de mAb MRG1, 2600 ng/ml de mAb Kat4c o 600 ng/ml de anticuerpo policlonal de conejo anti-CEACAM. Después de una hora de incubación en hielo, se

añadieron 50.000 células 721.221/CEACAM1 y se midió la secreción de IL-2 de ratón mediante ELISA sándwich (R&D Systems).

RESULTADOS

5 **[0138]** Como se representa en el Ejemplo 3, anteriormente, los inventores demostraron un bloqueo casi completo de la actividad de CEACAM1 usando 15 ng/ml de mAb MRG1. Por el contrario, el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 Kat4c fue capaz de producir un efecto de bloqueo menor solo cuando se probaron concentraciones 200 veces mayores y el anticuerpo policlonal de conejo anti-CEACAM produjo un efecto inhibitor similar con una
10 concentración 40 veces mayor (2.600 ng/ml y 600 ng/ml, respectivamente, Figura 8).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para uso, en combinación con linfocitos en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene las secuencias CDR y orientación del anticuerpo producido a partir de una célula hibridoma que ha sido depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9974.
- 10 **2.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para su uso de la reivindicación 1, en donde dichos linfocitos comprenden células T o células NK.
- 3.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para su uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado está unido a un resto citotóxico.
- 15 **4.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para uso de la reivindicación 3 en donde dicho resto citotóxico comprende una citotoxina, una quimioquina, una quimioterapia, un proapoptótico, un interferón, un resto radioactivo o combinaciones de los mismos.
- 20 **5.** Un método in vitro de inmunomodulación, comprendiendo el método la puesta en contacto de un linfocito que expresa CEACAM1 con un anticuerpo anti CEACAM1 aislado o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene las secuencias CDR y orientación del anticuerpo producido a partir de una célula de hibridoma que ha sido depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9974.
- 25 **6.** El método de la reivindicación 5, en donde los linfocitos que expresan CEACAM1 son linfocitos infiltrantes de tumores o células NK.
- 7.** El método de la reivindicación 5, en donde los linfocitos que expresan CEACAM1 son células T citotóxicas.
- 30 **8.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los linfocitos se administran al sujeto antes de la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 35 **9.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones en donde los linfocitos se administran al sujeto de forma concomitante con la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 40 **10.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los linfocitos se administran al sujeto después de la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 45 **11.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-10, en donde los linfocitos se obtienen del sujeto y se tratan por métodos de expansión ex vivo.
- 50 **12.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-11, en donde el sujeto es tratado por otro tratamiento anticancerígeno antes de la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o antes a la administración de los linfocitos.
- 55 **13.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para su uso según la reivindicación 12, en donde el otro tratamiento anticanceroso es quimioterapia o radioterapia.
- 60 **14.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-13, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: melanoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de cuello uterino, cáncer de páncreas, leucemia, linfoma, cáncer relacionado con células mieloides, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer biliar o cáncer de endometrio.
- 65 **15.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti CEACAM1 aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-13, en donde el cáncer es melanoma.

FIG. 1A

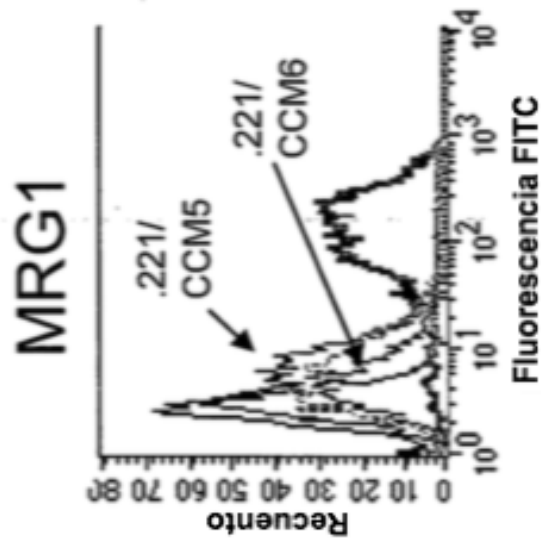


FIG. 1B

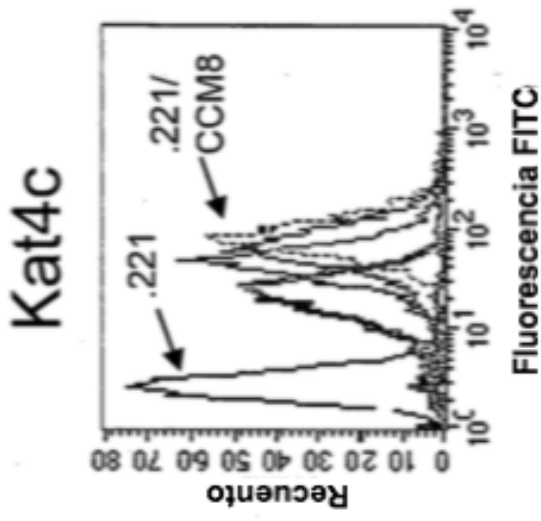


FIG. 2

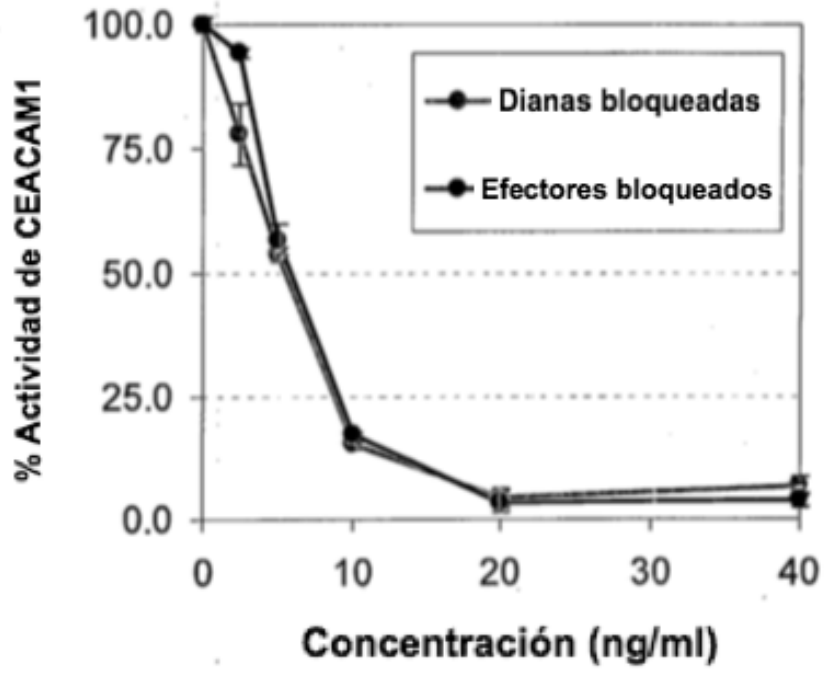


FIG. 3

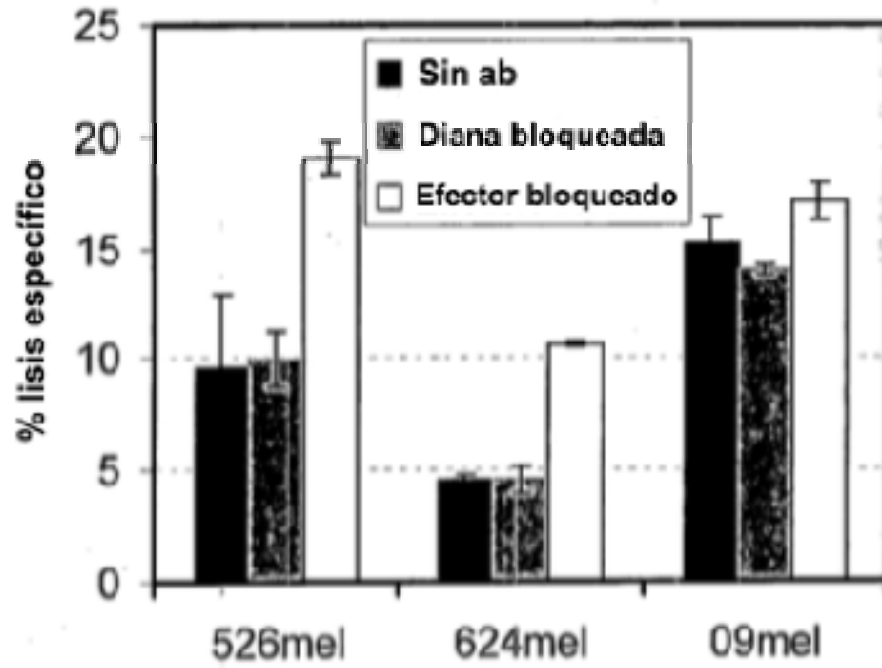


FIG. 4

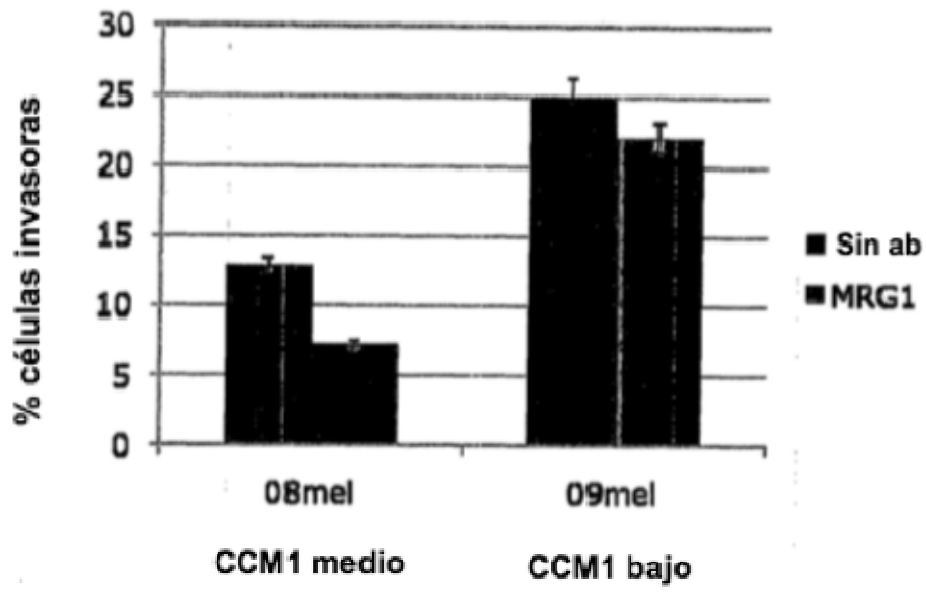


FIG. 5

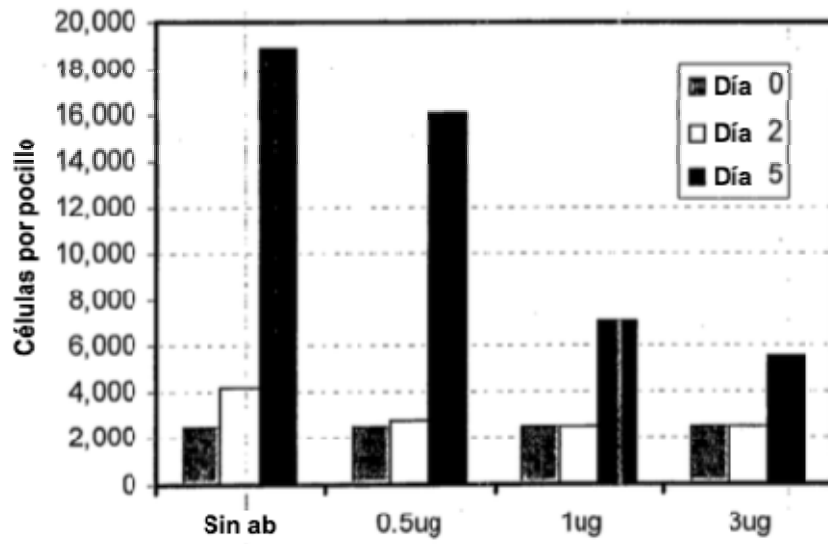


FIG. 6A

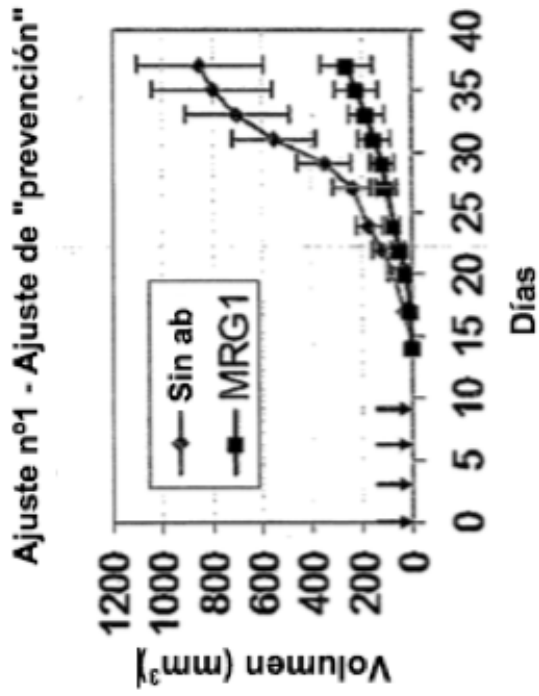


FIG. 6B

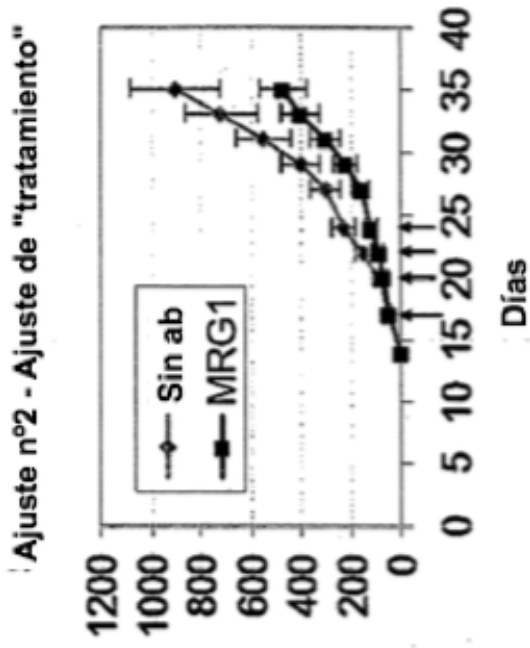


FIG. 7

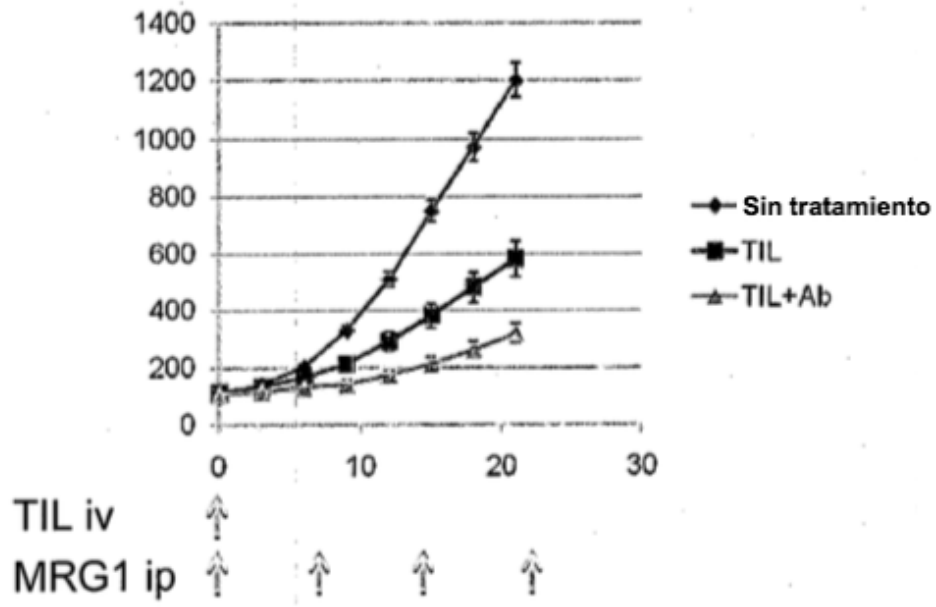


FIG. 8

